

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES KALLIKREINS
AUS MENSCHLICHER KOLON-SCHLEIMHAUT

Arend BILLING

—

1979
—

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Biochemie
Leiter: Prof.Dr.rer.nat.H.Fritz
und der Chirurgischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.med.G.Heberer

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES KALLIKREINS
AUS MENSCHLICHER KOLON-SCHLEIMHAUT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Arend Billing

aus
Göttingen

München 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:

Prof.Dr.H.Fritz

Mitberichterstatter:

Prof.Dr.G.Heberer

Dekan:

Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.1979



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
Zusammenfassung	3
1 <u>Einleitung und Zielsetzung</u>	4
1.1 Überblick	4
1.2 Aufgabenstellung	5
2 <u>Übersicht</u>	5
2.1 Eigenschaften und Bedeutung der Kallikreine	5
2.11 Geschichtlicher Überblick	5
2.12 Biochemie	6
2.13 Physiologie und Pathophysiologie	10
2.2 Stand der Kenntnisse über das Darmkallikrein	12
2.21 Geschichtlicher Überblick	12
2.22 Biochemie	13
2.23 Physiologie und Pathophysiologie	14
3 <u>Eigene Untersuchungen</u>	16
3.1 Vorbemerkungen	16
3.11 Definition der Einheiten	16
3.12 Bestimmungsmethoden der Kallikreinaktivitäten	16
3.121 am Hundekreislauf	16
3.122 am Rattenuterus	17
3.123 Enzymatische Bestimmung	19
3.2 Isolierung des Darmkallikreins	20
3.21 Homogenisieren und Aufbereitung der Lösungen	20
3.22 Weitere Reinigung und Anreicherung	23
3.221 Proteinfällung	23
3.222 Dialyse und Lyophilisieren	26
3.223 Gelfiltration an Sephadex G-100	27
3.224 Gelfiltration an Sephadex G-150	32
3.23 Zusammenfassung der Isolierung	34

3.3	Untersuchungen am isolierten Enzym	36
3.31	Bestimmung des Molekulargewichtes	36
3.32	Die Aktivierung von Präkallikrein	37
3.321	Methodik	37
3.322	Ergebnisse der Aktivierung	39
3.323	Einfluß der Aktivierung auf das Molekulargewicht	40
3.33	Untersuchungen zur Spezifität des Enzyms	41
3.34	Untersuchung des pH-Optimums	43
3.35	Immunologische Untersuchungen	44
3.36	Bestimmung des Hemmspektrums	47
3.361	DFP-Wirkung	48
3.362	Trasyolol-Wirkung	49
3.363	Wirkung von Inhibitoren aus Humansperma	50
3.364	Benzamidin-Wirkung	51
3.365	Pflanzliche Proteasen-Inhibitoren	52
3.366	Proteasen-Inhibitoren des Blutplasmas	53
3.367	Weitere Inhibitoren	53
3.368	Ergebnisse	54
4	<u>Diskussion</u>	55
4.1	Isolierung des Enzyms	55
4.2	Einordnung des gefundenen Enzyms	56
4.3	Medizinische Bedeutung	58
5	<u>Literaturverzeichnis</u>	61
6	<u>Lebenslauf</u>	67

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.1)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BzArgNHNP	Benzoyl-DL-arginin-p-nitranilid
BzArgOEt	Benzoyl-L-argininmethylester
DFP	Diisopropylfluorophosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
HMW	high molecular weight
HSK	Humanserumkallikrein
LMW	low molecular weight
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
SBJ	Sojabohnentrypsin inhibitor
SN	supernatant (Überstand)
TRA	Triäthanolamin-hydrochlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
Try	Trypsin (E.C.3.4.4.4)
U	enzymatische Einheit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zusammenfassung

In menschlichem post mortalem Kolongewebe wurde ein Enzym gefunden, das aus Kininogen Kinine freisetzt. Es besitzt zugleich eine esterolytische Aktivität gegenüber BzArgOEt.

Das Vorliegen weiterer esterolytischer Enzyme konnte durch Anwendung von spezifischen Substraten und Inhibitoren weitgehend ausgeschlossen werden. Die Existenz eines Darmkallikreins ist daher anzunehmen.

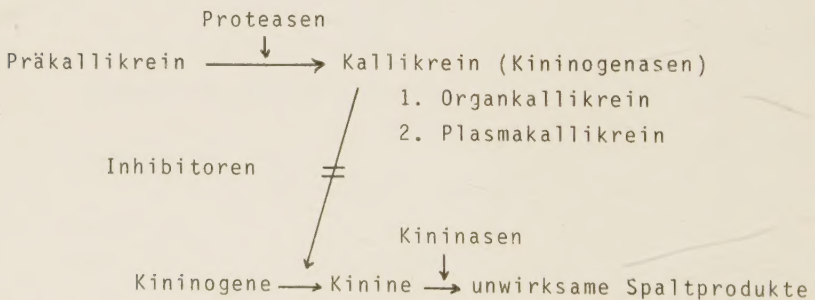
Die Reinigung der Kininogenase erfolgte durch Ultrazentrifugation, Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration. Das Molekulargewicht des Enzyms (70 000) ähnelt dem des Serumkallikreins (86 000-97 000). Sein Hemmspektrum entspricht jedoch dem der Organkallikreine. Immunologisch zeigt es keine Ähnlichkeit mit Serumkallikrein.

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Überblick

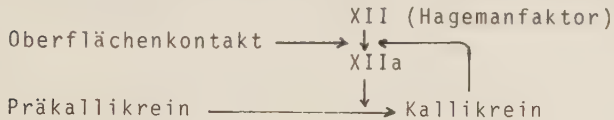
Forschungsergebnisse der letzten Jahre messen dem Kallikrein-Kinin-System bei physiologischen und auch pathophysiologischen Vorgängen immer größere Bedeutung bei. Es scheint eine führende Rolle bei der Interaktion wichtiger proteolytisch gesteuerter Systeme einzunehmen. Der Zusammenhang von Kallikrein-Wirkung und Blutgerinnung, Blutdruckregulation, Transportmechanismen der Zelle (Glucose) und männlicher Fertilität (s. Kap. 2.13) wird, obwohl zum Teil erst in den vergangenen 5 Jahren entdeckt, schon therapeutisch genutzt. Besonders eindrucksvoll ist die Erkenntnis der vielfältigen Wirksamkeit der Kinine *in vivo*, so daß ein ursprünglich einfaches Grundprinzip heute als Basis eines sehr komplexen Geschehens gelten kann.

Aus Kininogenen werden durch die Kininogenase K a l l i k r e i n Kinine freigesetzt, die den eigentlichen Wirkstoff des Kallikrein-Kinin-Systems darstellen. Die Kinine werden ihrerseits durch Kininasen rasch abgebaut.



Entgleisung in diesem Aktivierungs-/Inaktivierungsmechanismus können pathologische Erscheinungen auslösen oder begleiten (1,11).

Zusätzlich zu dieser Wirkung können die Plasmakallikreine direkt in das Gerinnungs-/ Fibrinolysesystem eingreifen, indem sie den Hagemanfaktor zu aktivieren vermögen.



1.2 Aufgabenstellung

Während generell die Kallikreine der Gruppe der Organkallikreine bzw. der Plasmakallikreine zugeordnet werden (s. Kap. 2.12), war eine entsprechende Zuordnung des Dickdarmkallikreins bisher umstritten (s. u.). Hier die Klassifizierung durch Erforschung weiterer Eigenschaften des Kallikreins aus menschlichem Kolon voranzutreiben, war Ziel dieser Arbeit. Zu diesem Zweck wurden vor allem das immunologische Verhalten, das Molekulargewicht und das Verhalten gegenüber einer Reihe von Inhibitoren untersucht. Voraussetzung war die Entwicklung eines Verfahrens, das die Isolierung des Enzyms in relativ reiner Form aus Darmschleimhaut gestattete.

2. Übersicht

2.1 Eigenschaften und Bedeutung der Kallikreine

2.11 Geschichtlicher Überblick

Bei experimentellen Studien über die reflektorische Anurie entdeckte E.K.Frey 1925 die blutdrucksenkende Wirkung von i.v. appliziertem Harn. Im Verlauf weiterer systematischer Forschung konnten Frey, Kraut und Werle aus Blut eine Substanz mit gleicher Wirkung gewinnen. In Bauchspeicheldrüsen fanden sich schließlich so große Mengen der blutdrucksenken-

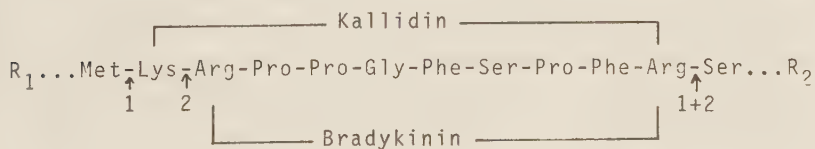
den Substanz, daß hier der Ursprungsort vermutet wurde. So wurde das Enzym nach "kallikreas", einem griechischen Synonym für Pankreas, "Kallikrein" genannt (1). Seitdem wurden Kallikreine in weiteren Organen und Körperflüssigkeiten nachgewiesen und eine Reihe neuer Aspekte hinsichtlich ihrer Funktion entdeckt.

2.12 Biochemie

Das Enzym Kallikrein (E.C.3.4.21.8) ist ein Glycoprotein. Es gehört zu der Gruppe der Peptidylpeptid-Hydrolasen, besitzt aber einen gewissen Sonderstatus auf Grund seiner hohen Substratspezifität. Diese ist darauf zurückzuführen, daß das aktive Zentrum des Kallikreins mit mindestens 5 aufeinanderfolgenden Aminosäureresten seines Substrates in Wechselwirkung tritt, d.h. das Substrat muß in 5 Code-Punkten zum Enzym passen (14,47). Durch Spaltung zweier Peptidbindungen setzt es aus Kininogen, einem sauren α -2-Glykoprotein, die pharmakologisch sehr aktiven Kinine frei (s.u.). Der aktuelle Kininspiegel wird durch die vorhandene Kallikreinaktivität determiniert. Die Wirkung der Kinine setzt sofort ein und klingt rasch ab, da sie durch Kininasen rasch gespalten werden: Beim Menschen liegt die in vivo Halbwertszeit für Bradykinin unter einer halben Minute. Die Kallikreinwirkung tritt dagegen verzögert auf, da in einer Zeitreaktion erst die Kinine freigesetzt werden müssen. Entsprechend der Wechselzahl des Enzyms wird pro Zeiteinheit nur eine bestimmte Zahl von Kininogenmolekülen gespalten. Die Reaktion wird begrenzt durch Inhibierung des Kallikreins und gelegentlich auch durch Erschöpfung des Kininogenvorrates. Im Körper wurden fast ubiquitär zahlreiche Inhibitoren nachgewiesen. Kallikreine besitzen außerdem eine estero lytische Aktivität, die sich vorwiegend gegen Arginin-derivate richtet. Für diese ist dasselbe, auch Kinin-liberierende Zentrum anzunehmen, da

Hemmstoffe stets beide Wirkungen gemeinsam reduzieren. Über eine physiologische Bedeutung der Esterspaltung ist nichts bekannt. Von anderen Proteinasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Plasmin unterscheidet sich das Enzym hinsichtlich des Molekulargewichtes, des Hemmspektrums und der Substratspezifität (2,15).

Die Kallikreine werden in Serum- oder Plasma- und Organkallikreine unterteilt. Das Serumkallikrein unterscheidet sich in einer Reihe von Eigenschaften von den "Organ"-Kallikreinen, die z.B. aus Speicheldrüsen, Pankreas, Lunge und Niere gewonnen wurden. So setzt Serumkallikrein ausschließlich das Nonapeptid Bradykinin frei, und zwar nach neueren Ergebnissen (11) bevorzugt aus einem HMW (high molecular weight) Kininogen (MG 100 000 - 200 000). Die Organkallikreine spalten dagegen LMW (low molecular weight) Kininogen (MG 50 000- 70 000) stets zum Decapeptid Kallidin (3,4).



Angriffspunkte der Kallikreine am Kininogenmolekül:

1. Organkallikrein, Spaltprodukt ist Kallidin
2. Serumkallikrein, Spaltprodukt ist Bradykinin

Ein Teil des freigesetzten Kallidins wird sekundär zu Bradykinin umgewandelt. Ursache dafür ist eine Aminopeptidase, die die Lys-Arg-Bindung spaltet (16).

Während die Organkallikreine wahrscheinlich im zugehörigen Gewebe synthetisiert werden, ist als Bildungsort für das Serumkallikrein die Leber und das übrige reticulo-

endotheliale System (RES) anzunehmen (1). Die beiden Kallikreingruppen unterscheiden sich auch hinsichtlich des Molekulargewichtes: Das Molekulargewicht der Organkallikreine wird mit 24 000- 33 000, das der Serumkallikreine mit 86 000- 97 000 angegeben. Während das Serumkallikrein nur als inaktive Vorstufe (Präkallikrein) vorliegt, findet man die Organkallikreine sowohl in aktiver (Harn, Speichel) als auch in inaktiver Form (Pankreas) (1,11). Deutliche Unterschiede zeigen sich auch in der Wirksamkeit von Hemmstoffen: Serumkallikrein wird im Gegensatz zu den Organkallikreinen durch eine Reihe pflanzlicher Protease-Inhibitoren empfindlich gehemmt (9). Gemeinsame Inhibitoren wurden aus Seeanemonen, Rinderorganen, Schnecken und Kartoffeln isoliert.

Die beiden wichtigsten Kinin-abbauenden Enzyme, die Kininase I und II, lassen sich ebenfalls gruppenmäßig zuordnen. Vieles deutet darauf hin, daß Kininase I vor allem im Blut wirkt, während die erst später entdeckte Kininase II im Gewebe die Kinine rasch inaktiviert (11). Kininase I ist eine Carboxypeptidase, die C-terminale Lysin und Argininreste abspaltet. Es wird angenommen, daß sie außer dem Bradykinin noch eine Reihe anderer Proteine mit C-terminalem Arginin beim Eintritt in die Blutbahn abbaut (11). Kininase II ist von großem Interesse, da sie identisch ist mit dem "converting enzyme", das Angiotensin I in Angiotensin II überführt. Angiotensin II ist der wirksamste bekannte Vasopressor und der wichtigste Stimulator der Aldosteronsekretion (7). Die Bedeutung des kleinen Blutkreislaufes für die Angiotensin-Umwandlung wurde besonders hervorgehoben, obwohl das Enzym auch in vielen anderen Organen in hoher Konzentration gefunden wurde (Niere, Hoden, Plexus Chorioideus). Wegen seiner höheren Affinität zum Enzym ist Bradykinin das gegenüber dem Angiotensin I bevorzugte Substrat der Kininase II.

Hieraus ergeben sich interessante Aspekte zur Behandlung der essentiellen Hypertonie: Ein künstlich erhöhter Kininspiegel müßte den Hypertonus senken (48,71).

Tab. 1 Wichtige Unterscheidungsmerkmale zwischen Organ- und Serumkallikrein

Merkmal	Organkallikrein	Serumkallikrein
Spaltprodukt	Kallidin	Bradykinin
Molekulargewicht	24 000-33 000	86 000-97 000
Wirksame pflanzliche Inhibitoren	nur Kartoffelinhibitoren	
Bevorzugtes Substrat	LMW-Kininogen	HMW-Kininogen
Syntheseort	in den entsprechenden Organen	in Leber und RES
Abbau des Produkts durch	Kininase II	Kininase I
Immunpräzipitat nur mit	Organ-Ke spezif. Ak	Serum-KE spezif.Ak

Allen Kallikreinen gemeinsam ist die Hemmbarkeit durch DFP (Diisopropylfluorophosphat), was die Annahme gestattet, daß ein Serinrest im aktiven Zentrum vorhanden ist. Immunologisch verhalten sich die Kallikreine je nach Spezies verschieden (1,28). Das bedeutet z.B., daß Ratten-Harnkallikrein zwar mit Ratten-Pankreaskallikrein, nicht aber mit den Antikörpern gegen menschliches Harnkallikrein kreuz reagiert. Inaktivierung mit DFP ändert die antigenen Eigenschaften nicht, d.h. aktives Zentrum und immunchemische Determinanten sind nicht identisch (1,S.47).

2.13 Physiologie und Pathophysiologie

Die Kinine besitzen eine außerordentlich hohe pharmakologische Aktivität. Bereits in ng- Mengen dilatieren sie die Blutgefäße (1,4). Die Folge ist in vivo ein scharfer systolischer und diastolischer Blutdruckabfall gefolgt von einer reflektorischen Zunahme des Herzminutenvolumens (1,15). Die meisten anderen glattmuskulären Hohlorgane werden direkt zur Kontraktion erregt (z.B. Bronchien, Uterus und Darm), in vivo wird die Magen-Darm-Tätigkeit gesteigert. Diese pharmakologischen Wirkungen sind auch die Basis der biologischen Nachweismethoden für Kallikreine (s.Kap. 3.12).

Die Kinine sind ferner in der Lage einen akuten Entzündungsvorgang auszulösen mit den klassischen Zeichen tumor, dolor, calor, rubor:

- a) Die Gefäßpermeabilität wird erhöht, was zu Odemen und vermehrter Zellemigration führt (7).
- b) An Nociceptoren erzeugen Kinine Schmerzempfindungen.
- c) Durch Vasodilatation wird der Entzündungsort erwärmt und gerötet.
- d) Leukocytenmobilisation und Phagocytose werden durch Chemotaxis gefördert.
- e) Bradykinin setzt Prostaglandine frei, die selbst Symptome der Entzündung erzeugen.

Außerdem wird der Lymphabfluß erhöht (59).

Plasmakallikrein ist an der Blutgerinnung beteiligt. Präkallikrein wird durch den aktiven Hageman-Faktor (XIIa) und dessen durch Proteolyse entstandenen Fragmente aktiviert und aktiviert seinerseits weiteren inaktiven Hageman-Faktor in Art eines positiven feed-back-Mechanismus (11,52). Es ist deshalb verständlich, daß die Gabe von Kallikrein-Antiserum beim Kaninchen eine Gerinnungsstörung im intrinsic-System erzeugt (49). Derselbe Effekt wird erreicht durch gleichzeitige Injektion von Heparin und Antithrombin III, wodurch ebenfalls das Plasmakallikrein

gehemmt wird (51). Dagegen verkürzt eine Infusion von Plasmakallikrein (ebenfalls beim Kaninchen durchgeführt) die Prothrombinzeit (50).

Die Bedeutung dieser Erkenntnisse für die Human-Medizin zeigte sich, als man ein Familiensyndrom, die sog. Fletcher-Krankheit fand (11,17). Bei diesem Syndrom kann eine ererbte, verzögerte in vitro Gerinnung mit verlängerter Prothrombinzeit durch Gabe von Präkallikrein erfolgreich behandelt werden.

Über den Hageman-Faktor scheint auch ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Komplement- und des Kallikrein-Systems zu bestehen (53).

In der Niere wirkt das dort gebildete Kallikrein als partieller Antagonist des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (s.o.). Neben der oben beschriebenen kompetitiven Hemmung des converting enzymes durch Kinine steigert das Nierenkallikrein die Natriurese. Eine Erhöhung des Extrazellulärvolumens bewirkt über die Kallikreinaktivierung eine vermehrte Nierendurchblutung, die Natriurese steigt an (19, 20, 55). Diese Wirkung ist der des Aldosterons entgegengesetzt.

Bei allen Schockzuständen wurde eine Korrelation zwischen Schockschwere und Abfall des Präkallikrein-Spiegels gefunden (11,18). Die Blutversorgung der Eingeweide ist dabei von besonderem Interesse. Sie stellt vielleicht eine durch die Kallikreine beeinflusste Schlüsselrolle beim Schock dar (32). Eine Beeinflussung des Krankheitsbildes durch Kallikrein-Inhibitoren ist möglich (39, 40). Die hochdosierte Trasylol-Therapie u.a. bei Pankreatitis hat hier zu klinischen Erfahrungen verholfen.

Ein weiterer medizinischer Bezug besteht in der Therapie von Fertilitätsstörungen beim Mann. Wiederholte Kallikreininjektionen bewirkten eine signifikante Zunahme der absoluten Spermienzahl und -beweglichkeit und eine Abnahme der fehlgebildeten Spermien im Ejakulat von behandelten Patienten (56, 57).

Auch in anderen Körperzellen steigern Kallikreine bzw. die Kinine Zellteilungen und Proliferation. Bei Ratten erhöht die Infusion von Pankreas-Kallikrein die DNS-Synthese und Mitoserate in Knochenmark und Thymus (58). In anderen Geweben der Ratte wird durch Gabe von ca. 100 U/100g Körpergewicht der DNS-Gehalt deutlich vergrößert (22). Bestimmte Carcinoide aktivieren Kallikrein, die freiwerdenden Kinine tragen dann wahrscheinlich wieder zu vermehrtem Wachstum bei (1).

Den Drüsenkallikreinen wird eine lokale Wirkung (u.a. Steigerung von Durchblutung und Gefäßpermeabilität) zugeschrieben.

Eine weitere wesentliche Aufgabe soll dem Kallikrein-Kinin System bei der Einschleusung von Glucose in die Zelle zukommen (48).

Die Kenntnisse über Wirkungen des Kallikreins am Darm sind in Kap. 2.23 zusammengestellt.

2.2 Stand der Kenntnis über das Darmkallikrein

2.21 Geschichtlicher Überblick

Werle und Vogel fanden Anfang der sechziger Jahre im Homogenat der Kolon-Wand eine Substanz die durch Trypsin aktiviert wurde und bei Injektion den Hundeblutdruck erniedrigte (12). Sie wirkte somit wie ein Kallikrein. Später wurde dieses Enzym in geringerer Menge auch in Magenschleimhaut und sehr wenig im Dünndarm nachgewiesen (1).

In der Folge zeigten Amundsen und Nustad (60) und später Burger, Lembeck und Wagner (61), daß ein Homogenat aus Darmschleimhaut Kinin-freisetzende Aktivität enthält. Zeitlin fand 1971 Hinweise darauf, daß das aus Rattendarm gewonnene Enzym in seinen Eigenschaften den Organ-kallikreinen ähnlich ist (62). Erdös et al. isolierten

1972 aus Menschen-, Hunde- und Affendarm dagegen ein Enzym, das sich eher wie Plasma-Kallikrein verhielt (10).

Die beschriebenen Ergebnisse sind also wenig ergiebig und zum Teil widersprüchlich (1, 6, 10, 29). Der Grund hierfür mag in der Unbeständigkeit des Enzyms (s.Kap. 3), in Speziesunterschieden (6) oder ungenügender Reinheit der untersuchten Proben zu suchen sein.

2.22 Biochemie

Im Homogenat der Kolonschleimhaut wird sowohl enzymatisch aktives als auch inaktives Kallikrein gefunden. Das inaktive Präkallikrein wird wahrscheinlich in das Darmlumen sezerniert; es wird im Darmlumen durch Trypsin aktiviert. Wodurch Präkallikrein in der Darmwand selbst aktiviert wird, ist unbekannt. Eine Aktivierung von Darmpräkallikrein durch den Hageman-Faktor (XII) *in vitro* ist beschrieben (41). Eine endokrine Sekretion ist nicht bewiesen.

Große Meinungsverschiedenheiten treten auf bei der Frage nach der Zuordnung zur Gruppe der Organ- oder Serulkallikreine. So fanden Seki, Nakajima und Erdös (10) in menschlichem Kolon eine Kininogen-spaltende Substanz mit einem Molekulargewicht von 71 000. Diese setzte Bradykinin und Kallidin im Verhältnis 86 : 14 frei und hatte ein Hemmspektrum ähnlich dem des Serulkallikreins. Als Substrat verwendeten diese Autoren indessen ein menschliches LMW-Kininogen, das bevorzugte Substrat der Organkallikreine. Zeitlin et al. (6) beschreiben dagegen ein Kallikrein aus Rattenkolon mit einem Molekulargewicht von 33 000 und einem Hemmspektrum ähnlich dem der Organkallikreine.

Diesen Differenzen galt es nachzugehen.

2.23 Physiologie und Pathophysiologie

Zur physiologischen Funktion des Darmkallikreins stehen endgültige Beweise noch aus. Während einerseits das Kolon als Bildungsstätte des Plasmakallikreins diskutiert wurde (10), wird zum anderen ein lokaler Wirkungsmechanismus untersucht. Das Darmkallikrein ist jedenfalls kein resorbiertes Pankreaskallikrein, da beim Hund nach Pankreasexstirpation der Kallikreingehalt der Darmwand unverändert bleibt (8). Abhängig ist die gefundene Kallikreinmenge dagegen von der Art der Nahrung. Nach Fleischfütterung ist der Kallikreingehalt des Rattendarmes annähernd verdoppelt (1).

Am Darm mit seiner außerordentlich hohen Mitoserate {Lebensdauer der Resorptionszellen 3-5 Tage (7)} interessiert auch der Einfluß von Kallikrein auf DNS-Syntheserate und Zellteilung. Beschrieben ist eine signifikant erhöhte Mitoseaktivität in Duodenum und Jejunum der Ratte nach intraluminaler Injektion von 10-50 U Kallikrein (21). Die DNS-Synthese konnte bei jungen Ratten in verschiedenen Geweben durch Kallikreinbehandlung erhöht werden (22).

Die Resorption von Zuckern und Aminosäuren soll durch Kallikreingabe in vivo und in vitro gesteigert werden (23, 24). Auch die Wirkung auf die Vitamin B₁₂-Resorption des Menschen wurde untersucht. Bei Patienten mit einer 2/3 Magenresektion bewirkte ein oral verabreichtes Kallikreinpräparat eine statistisch signifikante Steigerung der Vitamin B₁₂-Aufnahme aus dem Darm. Die Bedeutung dieses Mechanismus bei perniziöser Anämie ist noch nicht geklärt (63).

Die Salz-Wasser-Resorption ist am Kolon von besonderem Interesse. Hier fand man, daß bei normalen Tieren (hier: Ratten) intraperitoneal oder intraluminal (d.h. in das Darmlumen) injiziertes Kallikrein die Salz-Wasser-Resorp-

tion erniedrigen kann, während es bei Tieren mit Ligatur des ductus pancreaticus die Resorption bis fast auf das normale Maß steigert. Ein Angriff am aktiven Natrium-Transport scheint möglich (25). Die durch Kinine auslös-bare Erhöhung der Kapillarpermeabilität (1, 11) könnte für die beschriebenen Effekte mitverantwortlich sein. Auch fand man in den tieferen Epithelschichten des Rat-tendarms elektronenmikroskopisch ein tubulo-vesikuläres System, das sich in den Interzellulär-Raum öffnet und durch Kallikrein stimulierbar ist (59).

Ein pathophysiologischer Aspekt des Kolon-Kallikreins wurde am Beispiel der colitis ulcerosa (einer entzünd-lichen Erkrankung des Kolons mit unbekannter Genese) untersucht (64). Am gesunden Darm findet man Kallikrein ausschließlich in der Schleimhaut, während in der tunica muscularis nur Kininogen nachweisbar ist. Im exstirpier-ten Darm von Patienten mit akuter colitis ulcerosa war dagegen Kallikrein insgesamt deutlich vermehrt und außer-dem in die Muskelschicht eingedrungen. Da die Kinine die Ringmuskulatur des Dickdarms erschlaffen lassen, die Längsmuskulatur (Tänien) aber kontrahieren können (65), lassen sich so vielleicht einige Befunde erklären: Bei colitis ulcerosa-Patienten ist die Kolon Motilität deut-lich vermindert, im Röntgenbild ist der Darm weit und starr ("lead pipe"), dabei insgesamt oft verkürzt. Zum Vergleich wurde die nicht entzündliche Divertikulose untersucht. Hier war das Kallikrein-Kinin-Vorkommen un-verändert.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Vorbemerkungen

3.11 Definition der Einheiten

Zur Bestimmung der Kallikrein-Aktivität werden die estero-lytischen und biologischen Eigenschaften des Enzyms verwendet. Eine enzymatische Kallikrein-Einheit (U) ist diejenige Menge Kallikrein, die ein Mikromol Substrat unter Standardbedingungen spaltet.

Eine biologische Kallikrein-Einheit (KU) ist die Menge Kallikrein, die am Hundeblutdruck dieselbe Wirkung zeigt wie 5 ml normaler menschlicher Harn nach Dialyse.

Zwischen enzymatischer und biologischer Einheit besteht dabei die Beziehung $1U \approx xKE$, wobei x je nach Kallikrein Art zwischen 0,8 und 8,8 variiert.

Beim Test am Rattenuterus (s.Kap. 3.122) läßt sich durch Verwendung von Vergleichslösungen die pro Ansatz freigesetzte Kininmenge direkt in μg angeben.

3.12 Bestimmungsmethoden für Kallikrein-Aktivität

3.121 Am Hundekreislauf

Die klassische Nachweismethode für Kallikrein ist die Blutdrucksenkung im großen Blutkreislauf des Hundes nach i.v. Injektion (1, 31). Das Tier sollte dazu narkotisiert und künstlich beatmet werden. Zwischen zwei Versuchen müssen jeweils ausreichende Erholungszeiten eingehalten werden. Die zu verwendende Enzym Menge liegt bei 0,01-0,03 KU/kg. Als Standard dient meist ein käufliches Kallikreinpräparat, z.B. Padutin[®].

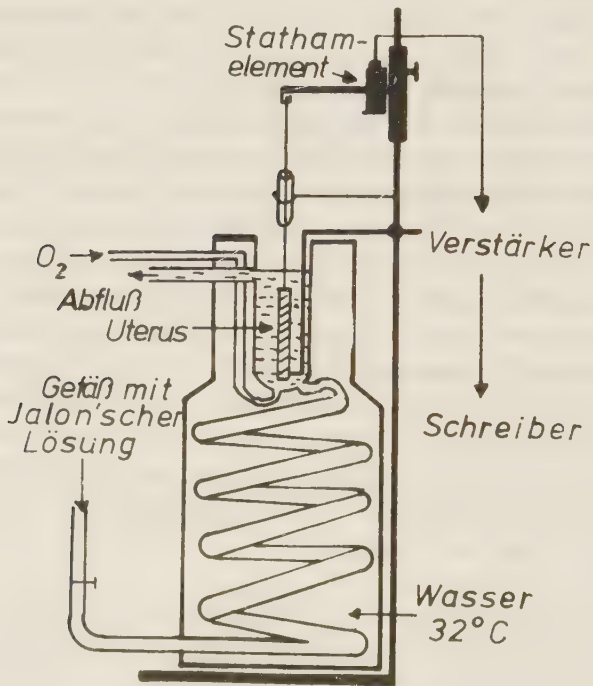
3.122 Am Rattenuterus

Ein sehr empfindlicher und zuverlässiger biologischer Test wurde kürzlich von K. Mann und R. Geiger beschrieben (26, 27). Die Kallikrein-bedingte Kinin Freisetzung wird dabei an einem isolierten Rattenuterus gemessen. Als Kallikrein Substrat dient menschliches HMW-Kininogen, das selbst keine Kallikrein-Aktivität besitzt. Je 3 mg Kininogen werden 30 min bei 37°C in 100 µl 0,15M Tris/HCl Puffer, pH 8,6, 4mM Na₂EDTA und 10mM 8-Hydroxyquinolin inkubiert. Dann werden 100 µl dieser Substratlösung mit 100 µl der kallikreinhaltigen Lösung und 50 µl des obigen Puffers 4 Std. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt mit 50 µl Trasylol (500 KIU) und zehnminütigem Kochen. Danach wird kurz abzentrifugiert. Je nach Bedarf werden 50-200 µl vom Überstand der Uterusbadflüssigkeit zugesetzt. Als Badflüssigkeit wird Jalonsche Lösung verwendet: 90g NaCl, 4g KCl, 0,7g CaCl₂, 5g D-Glucose, 5g NaHCO₃, 1mg Atropin gelöst in 10 l aqua dest. Die durch freigesetztes Kinin bedingte Kontraktion des isolierten Rattenuterus wird aufgezeichnet und vermessen (s. Abb. 1), die Kontraktionsstärke mit der nach Gabe von Standardlösungen von Bradykinin verglichen. Die zu verwendenden Mengen liegen bei 0,4-4 ng Bradykinin; der Reliabilitätsfaktor beträgt ca. 97%.

Inhibitorwirkungen können bestimmt werden, indem man ein aliquot des Inhibitors mit standardisiertem Rattenurin-Kallikrein vorinkubiert. Der prozentuale Aktivitätsabfall gegenüber dem ungehemmten Enzymstandard wird ausgetestet und entspricht dem Grad der Hemmung.

Als Maß für die Enzymaktivität dient die Menge Kinin, die durch eine definierte Menge Enzymprotein unter diesen Standardbedingungen freigesetzt wird.

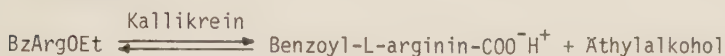
Abb. 1 Versuchsanordnung für den Rattenuterus-Test



3.123 Enzymatische Bestimmung

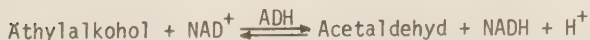
Aus der Gruppe der Ester die durch Kallikrein gespalten werden, eignet sich der Benzoyl-L-arginin-äthylester (BzArgOEt) besonders gut zur Messung der Esterolyseaktivität einer kallikreinhaltigen Probe. An diesem Substrat ist die Spaltungsgeschwindigkeit am größten. Der Ablauf der Reaktion ist wegen der veränderten Extinktion der Reaktionsprodukte photometrisch gut zu verfolgen (1).

Die Reaktion:



wurde mit zwei Methoden erfaßt:

1. Mit Hilfe des Autotitrators wurden die freiwerdenden Wasserstoffionen mit $2,5 \times 10^{-5} \text{ N NaOH}$ neutralisiert (30). Der pH-Wert wurde nach Bedarf festgelegt und automatisch konstant gehalten. Zur Reaktion wurden dabei eingesetzt: 2 ml aqua dest., 1 ml BzArgOEt-Lösung ($3 \times 10^{-3} \text{ M}$) und 100 µl Enzymlösung. Um die notwendige CO_2 -freie Atmosphäre zu erhalten, wurde die Lösung mit Stickstoff perfundiert. Der NaOH-Verbrauch pro min ist dann der Reaktionsgeschwindigkeit proportional. Der Reaktionsverlauf wurde in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.
2. Im kombinierten BzArgOEt/ADH-Test wurde der freiwerdende Äthylalkohol in einer Folgereaktion durch ADH oxidiert und H^+ auf das Coenzym NAD übertragen. Die Bildung von NADH_2 und damit die BzArgOEt-Spaltung wurde photometrisch verfolgt.



Testansatz:

2,3 ml Pyrophosphat-Puffer:

15,7g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$; 4,1g Semikarbazid und 0,9g Glycin in aqua dest. lösen; mit 2N NaOH auf pH 8,7 einstellen, mit aqua dest. auf 500 ml auffüllen.

0,1 ml NAD (20 mg in 1 ml aqua dest. lösen)

0,02 ml ADH (30 mg Enzymprotein/ml)

0,5 ml BzArgOEt (20 mg in 1 ml aqua dest. lösen)

Der Ansatz wurde 10 min bei 25°C inkubiert, dann die Reaktion durch Zugabe von Kallikrein gestartet und 5 min photometrisch bei 366 nm verfolgt. Eine Extinktionsänderung von 0,0011 $\Delta E/\text{min}$ entspricht dann 1 mU.

Die Hemmtests wurden mit demselben Testansatz durchgeführt, das Kallikrein aber 10 min (25°C) mit dem Inhibitor bei pH 7,8 vorinkubiert (5). Außerdem wurde auf Grund von Vorversuchen die BzArgOEt-Konzentration in der Küvette von 0,5 mM auf 0,1 mM reduziert, um so die Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes zu verringern und klarere Ergebnisse zu erzielen (9). Der Aktivitätsabfall gegenüber dem ungehemmten Enzym ergibt den Grad der Hemmung.

3.2 Isolierung des Darmkallikreins

3.2.1 Homogenisieren und Aufbereitung der Lösungen

Material

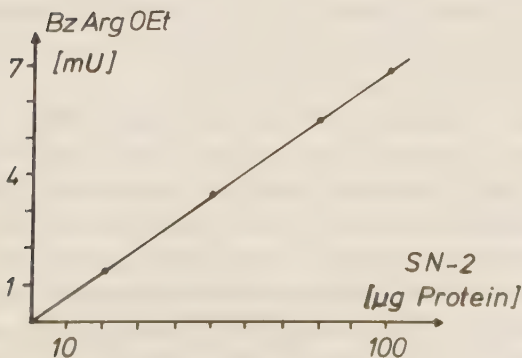
Menschliche postmortale Kolonpräparate wurden vom Pathologischen Institut der Universität München bezogen. Unmittelbar nach der Lieferung wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei ca. -70°C gelagert. Es wurden nur gesunde Darmabschnitte verwendet. Die Zeit zwischen Todeseintritt und Einfrieren wurde auch höchstens 24 Std. begrenzt.

Homogenisieren

Die aufgetauten Kolonpräparate wurden mit eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Mucosa und Submucosa wurden abpräpariert und gesammelt (insgesamt 1280 g Feuchtgewicht). Das Gewebe wurde mit dem Ultra-Turrax Homogenisator im zehnfachen Volumen (0,1g/1ml) eiskaltem 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 7,6 mit 10 mM CaCl_2 , 0,25 M Sucrose und 0,02 % NaN_3 homogenisiert.

Das Homogenat wurde bei 6000xg und 4°C 30 min zentrifugiert. Der trübe Überstand (supernatant -1) diente zunächst als Enzymquelle. Seine Proteinkonzentration betrug 4,4 mg/ml Biuret-Methode (36). Dieser Überstand 1 (SN-1) zeigte eine esterolytische Aktivität an Benzoyl-L-arginin-äthylester. Die im BzArgOEt/ADH-Test registrierte Extinktionsänderung war sowohl der Enzymkonzentration als auch der Reaktionszeit proportional (Abb. 2). Die spezifische Aktivität betrug 45 mU/ml bzw. 10,2 mU/mg.

Abb. 2 Abhängigkeit der Extinktionsänderung von der Enzymkonzentration; gemessen mit Hilfe des BzArgOEt/ADH-Tests.



Im biologischen Test am Rattenuterus setzten 100 ml dieser Lösung 2,4 μ g Kinin (Bradykinin-äquivalente) frei. Die Kinin-freisetzende Substanz hatte keine direkte Wirkung auf den Uterus: Ohne Vorinkubation mit Kininogen dem Uterusbad zugegeben zeigte sie keinen Effekt.

Das nach dem ersten Homogenisieren verbliebene Sediment-1 wurde mit dem oben beschriebenen Verfahren noch zweimal homogenisiert. Das erbrachte den Überstand SN-2 und SN-3. Dabei zeigte SN-2 eine Proteinkonzentration von 0,8 mg/ml und eine enzymatische Aktivität von 55 mU/ml, das bedeutet 68,8 mU/mg. SN-3 enthielt 0,35 mg Protein/ml und eine esterolytische Aktivität (BzArgOEt/ADH) von 13,6 mU/ml d.h. 38,9 mU/mg.

Da bei jedem Homogenisieren dieselbe Menge Lösungsmittel zugesetzt wurde (insgesamt jeweils 12,8 l), sind die Enzymkonzentrationen direkt vergleichbar: SN-1 enthielt 576 U, SN-2 704 U und SN-3 174 U pro jeweils 12,8 l. Das Feuchtgewicht der insgesamt verarbeiteten Darmschleimhaut betrug 1280 g.

Es ist bekannt, daß viele Proteine in Salzlösungen (bis zu 1M) besser löslich sind als in reinem Wasser (66). Proteine sind nämlich amphotere Substanzen, sie besitzen an ihrer Oberfläche positive und negative Ladungen. Eine Lösung in Wasser ist möglich, weil sich die bipolaren Wassermoleküle an diese Ladungen anlagern und so eine Wasserhülle bilden. Durch Zugabe von bestimmten Salzmengen erhöht sich die Ionenstärke, d.h. die Zahl elektrischer Pole, die Proteinlöslichkeit steigt an.

Das verbliebene Sediment-3 wurde daher noch einmal nach dem obigen Schema homogenisiert, die Lösung enthielt aber zusätzlich 1M NaCl. Außerdem wurde die Suspension vor dem Abzentrifugieren 48 Std. bei 4°C mit dem Magnetrührer gerührt, um so die Ausbeute zu erhöhen. Nachdem in der Lösung des SN-3 mit geringer Salzmolarität kaum noch Aktivität zu finden war (s.o.), betrug sie in der 1 molaren NaCl-Lösung 131,8 mU/ml, also rund das Zehnfache (1687 U/12,8 l). Die Proteinkonzentration mit dem Biuretreagens

wurde zu 10,5 mg/ml ermittelt; es errechnet sich somit eine spezifische Aktivität von 12,6 mU/mg.

Ultrazentrifugation

Der noch trübe SN-4 Überstand wurde dann zur weiteren Reinigung ultrazentrifugiert (40 000xg, 30 min, 4°C). Der entstehende klare SN-5 Überstand diente als Enzymquelle für alle weiteren Untersuchungen. Das Sediment wurde verworfen. Der Überstand 5 hatte eine Aktivität von 127 mU/ml was bei einer Proteinkonzentration von nur mehr 0,7 mg/ml einer fast fünfzehn-fachen Anreicherung der spezifischen Aktivität auf 181,4 mU/mg entspricht. Im Bioassay setzten 70 µg SN-5 1,2 µg Kinin (Bradykinin-äquivalente) frei.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Tab.2 Ergebnisse der Homogenisation

Lösung	enzym. Aktivität (mU/ml)	Proteingehalt (mg/ml)	spez. Aktivität (mU/mg)
SN-1	45	4,4	10,2
SN-2	55	0,8	68,8
SN-3	13,6	0,35	38,9
SN-4	131,8	10,5	12,6
SN-5	127	0,7	181,4

3.22 Weitere Reinigung und Anreicherung

3.221 Proteinfällung

Als nächster Reinigungsschritt wurde eine Proteinfällung angewendet. Es erfolgt dabei eine grobe Proteintrennung auf Grund der verschiedenen Löslichkeit der Proteine in Wasser. Eine Methode der Fällung besteht darin, die wässrige Proteinlösung mit einer unpolaren Flüssigkeit zu verdünnen.

Der Dipolcharakter der Wassermoleküle, der die Löslichkeit der Proteine ermöglicht (s.o.), wird dadurch geschwächt, die Proteine fallen aus. Eine Fällung durch Zugabe von 60% (v/v) Aceton bei 4°C erwies sich als ungünstig. Bei einem ersten Versuch an SN-5 (spez. Aktivität 149 mU/mg) lag die Ausbeute zwar bei 87%, eine weitere Acetonfällung an derselben Probe zerstörte die Aktivität aber vollständig. Die Methode wurde daher aufgegeben.

Ein schonenderes Verfahren ist die Anwendung von Ammoniumsulfat (66). Durch Zugabe neutraler Salze zur Protein-Wasserlösung wird den Proteinen der Wassermantel "geraubt", der für die Löslichkeit verantwortlich ist: Die polaren Salzionen verdrängen die Wasserdipole, die Proteine werden in der zunehmend unpolaren Flüssigkeit unlöslich. Bei ansteigender Ammoniumsulfatkonzentration fallen verschiedene Proteine bei verschiedenen Sättigungsgraden aus. Ein Maß dafür ist die sogenannte Aussalzkonstante K_s , die für jeden Stoff spezifisch ist. Sie gibt die Ionenstärke an, bei der die Löslichkeitsgrenze für die entsprechende Substanz überschritten wird und ist abhängig von der Polarität bzw. dem Dipolcharakter der Proteine. Durch die Wahl geeigneter Konzentrationen läßt sich so eine grobe Proteinfraktionierung durchführen. Die Methode hat den Vorteil, daß auch größere Volumina relativ schnell verarbeitet werden können.

Bei dem vorliegenden SN-5 Überstand zeigte sich, daß bei 60% Ammoniumsulfatsättigung [37 g% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] und 4°C das Enzym vollständig präzipitierte, so daß der Überstand aktivitätsfrei war (Tab. 3).

Tab. 3 Ausfällung des Enzyms bei steigender Ammoniumsulfatkonzentration (Temperatur: 4°C)

Ammoniumsulfatsättigung des SN-5 (% g/v)	0	20	40	60	80	100
Aktivität (mU/mg)						
im Überstand	181	183	180	0	0	0
nach der Fällung im wieder aufgelösten Präzipitat	0	172	187	215	196	179

Die beiden ersten Fällungen waren wenig ergiebig; erst bei 60% Sättigung fiel bei 4°C ein voluminöser Niederschlag aus. Eine Reinigung durch fraktionierte Fällung mit niedrigerer Konzentration war daher nicht sinnvoll.

Bei bis zu 20% gesättigter Lösung sedimentierte der Niederschlag langsam am Boden, während er bei 40% und 60% Sättigungsgrad nur schlecht bei 1xg sedimentierte und bei 80% und 100% Sättigung langsam nach oben wanderte und die Flüssigkeit abdeckte.

Zwei Wege boten sich an, um dieses Präzipitat abzutrennen:

1. Mittels Glasfilter wurden die Flocken abgefangen und dann mit Puffer (0,05 M Tris HCl pH 7,6 mit 0,05 M CaCl₂ und 0,02% NaN₃) ausgewaschen. Die Methode brachte eine Ausbeute von nur 26%, da viel Protein im Filter hängen blieb.

2. Die Ultrazentrifugation (40 000xg, 4°C, 30 min) ergab eine ausreichende Sedimentation der Präzipitate bei 60% Sättigung. Der Überstand enthielt wenig Protein wurde in wenig Puffer gelöst und filtriert. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 41% (s.Tab. 4).

Zur routinemäßigen Isolierung wurde auf Grund dieser Erkenntnisse folgendermaßen vorgegangen: Die jeweils verwendete Menge SN-5 Oberstand wurde zu 60% mit Ammoniumsulfat gesättigt [37g% (NH₄) SO₄], 30 min bei 4°C gerührt und 12 Stunden stehen gelassen. Dann wurden die 2 Phasen mittels der Ultrazentrifuge getrennt und die Präzipitate in ca. 1/10 des ursprünglichen Volumens gelöst (Bezeichnung P). Durch Filtration über ein Papierfilter wurde die Lösung vor der Weiterverarbeitung gereinigt.

Tab. 4 Ergebnisse der Ammoniumsulfatfällung mit drei verschiedenen Proben

	Gesamtausgangsaktivität (U)	nach Fällung		nach Filtration	
		(U)	(%) ^a	(U)	(%) ^a
Fällung 1	16,1	6,6	41	6,0	37
Fällung 2	12,3	-	-	4,8	39
Fällung 3	15,2	7,6	50	7,1	47

^aAusbeute an Aktivität bezogen auf die insgesamt eingesetzte Aktivität = Gesamtausgangsaktivität

Die wieder gelösten Präzipitate der Fällung (P) enthielten insgesamt, bei einer Proteinkonzentration von 3,9 mg/ml (Biuret), 780 mU Kallikrein mit einer spezifischen Aktivität von 200 mU/mg.

3.222 Dialyse und Lyophilisieren

Zwei Proben des gelösten Präzipitates (P) wurden 24 Stunden lang bei 4°C gegen jeweils 15 Liter aqua dest. dialysiert, der Dialyseschlauch wurde nach Beendigung mit

1 M NaCl-Lösung gespült. Die Aktivitäts-Verluste waren mit 8% gering (Tab. 5).

Das Dialysat wurde anschließend gefriergetrocknet, es verblieben insgesamt 81 mg Substanz.

Die Weiterverwendung der Methode wurde jedoch durch die schlechte Löslichkeit des Enzyms blockiert: Die beim Lyophilisieren erhaltene Trockensubstanz ließ sich weder im verwendeten Tris/HCl Puffer (pH 4-9) noch in 1 M NaCl-Lösung noch in 5% (v/v) Essigsäure lösen.

Ähnliche Probleme sind für das Kallikrein aus Schweinepankreas beschrieben (14). Während sie dort durch Anwendung von 50% Essigsäure behoben werden konnten, verbot sich ein solches Vorgehen hier wegen der hohen Säurelabilität des Enzyms (s. Kap. 3.31).

Die Methode wurde daher verlassen.

Tab. 5 Aktivitätseinbußen bei Dialyse und Lyophilisation von zwei Proben (je 1,5 ml)

Aktivität in (P)	Aktivität in dialysiertem (P)		Aktivität der Suspension des lyophilisierten (P)	
(U)	(U)	(%)	(U)	(%)
1,077	0,980	91	0,148	14
1,090	1,016	93	0,230	21

3.223 Gelfiltration an Sephadex G-100

Als nächster Reinigungsschritt für P folgte eine chromatographische Auftrennung mittels Gelfiltration (33).

Die Gelfiltrationstechnik ermöglicht eine Auftrennung von Molekülen nach ihrem Molekulargewicht. Das Sephadex-Gel besteht aus gequollenen Dextran-Polymeren. Diese haben je

nach Gelart verschieden große Poren. Moleküle die größer sind als die größten dieser Poren laufen mit der Flüssigkeit außen an den Gelpartikeln vorbei, sie können nicht eindringen. Je kleiner aber ein Molekül ist, desto häufiger und tiefer dringt es in die Gelporen ein, sein Durchlauf verzögert sich entsprechend. Läßt man eine Probe durch eine Säule eines solchen Gels laufen, so werden am schnellsten die größten Moleküle eluiert, die anderen folgen in der Reihenfolge des abnehmenden Molekulargewichts. Die Durchlaufzeit für Moleküle derselben Größe ist dabei unter gleichen Bedingungen konstant, sie ist als Maß für das Molekulargewicht zu verwerten. Mit Hilfe der Gelfiltration kann also z.B. ein komplexes Enzymgemisch aufgetrennt und auch das Molekulargewicht der Komponenten bestimmt werden.

Um das Präzipitat P weiter aufzutrennen, wurde zunächst das Gel Sephadex G-100 gewählt, da es den Molekulargewichtsbereich von $MG = 4000 - 150\,000$ umfaßt. Die einzelnen Parameter wurden gemäß Anleitung (34) gewählt und koordiniert. Es wurde eine Säule mit den Maßen $1,5 \times 70$ cm, d.h. 124 cm^3 Volumen verwendet. Das Gel wurde gequollen in $0,05\text{ M Tris/HCl pH } 7,6$ mit $0,005\text{ M CaCl}_2$, $0,2\text{ M NaCl}$ und $0,02\%$ NaN_3 zur Verhinderung mikrobiellen Wachstums. Mit demselben Puffer wurde die Säule bei 4°C nach dem Gießen äquilibriert und später entwickelt. Der Arbeitsdruck betrug 40 cm Wassersäule . Die Menge der aufgetragenen Proben überschritt 3 ml bzw. 12 mg Protein nicht, die Eluationsgeschwindigkeit betrug 10 ml/Std. Die Absorption des Eluates wurde fortlaufend bei 280 nm gemessen (Uvicord) und aufgezeichnet.

Die Trenneigenschaften der Säule wurden mit Toluidinblau geprüft. Die Säule wurde außerdem mit Dextranblau ($MG \sim 2 \times 10^6$), Rinderalbumin ($MG \sim 65\,000$) und Myoglobin ($MG \sim 17\,000$) kalibriert. Dann wurden in drei Läufen Proben von P aufgetrennt (Abb. 3). Es wurde ein hochmolekularer, steiler Peak A und ein zweigipfliger, kleinerer Peak B vom Schreiber aufgezeichnet.

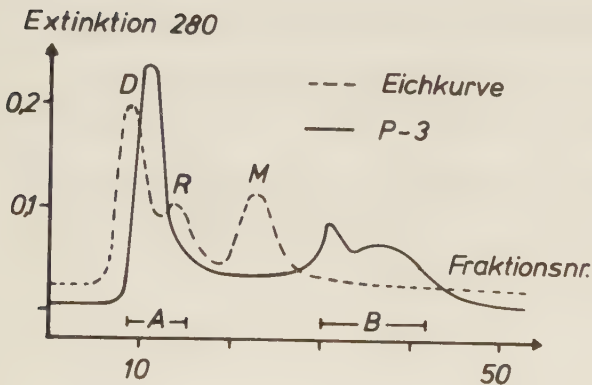
Abb. 3 Gelfiltration von P (Präzipitat der Ammoniumsulfatfällung) und den Eichsubstanzen:

A = Peak A; B = Peak B; D = Dextranblau;

R = Rinderalbumin; M = Myoglobin

Ordinate: relative Extinktion bei 280

Abszisse: Nummer der Fraktion (1,7 ml/Fraktion)

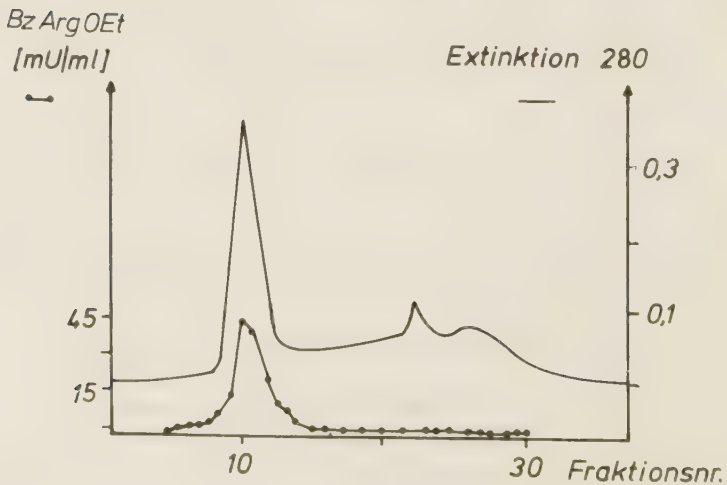


Nachdem so eine gute Auftrennung zu erreichen war und eine hohe Ausbeute erzielt werden konnte (s.u.), wurde zur präparativen Trennung eine größere Säule verwendet mit den Maßen $2 \times 90 \text{ cm} = 283 \text{ cm}^3$ Volumen. Die Durchflußrate betrug 34 ml/Std. . Alle anderen Parameter blieben unverändert. Die guten Trennergebnisse änderten sich dabei nicht; es konnte in jedem Lauf ein größeres Probenvolumen aufgetragen werden (bis zu 20 ml , d.h. 80 mg Protein).

Die fraktionsweise Auswertung der enzymatischen Aktivität ergab folgendes (Abb. 4):

- a) BzArgOEt-spaltende Aktivität war ausschließlich in Peak A nachzuweisen.
- b) Die jeweilige Aktivitätsverteilung deckte sich gut mit der Proteinverteilung.
- c) Die Ausbeute betrug ca. 89%, d.h. nahezu die gesamte aufgetragene Aktivität fand sich in Peak A wieder.
- d) Peak B war frei von esterolytischer Aktivität.

Abb. 4 Verteilung von Protein (—) und enzymatischer Aktivität (---) bei der Gelfiltration (links Peak A)



Zusammen mit Abb. 3 läßt sich errechnen, daß das Molekulargewicht der gefundenen Substanz deutlich größer als 65 000 ist. Eine genauere Bestimmung gemäß der Vorschrift in (34) erfolgt später.

Drei präparative Läufe sind quantitativ in Tabelle 6 erfaßt.

Dabei wurden von Peak A nur Fraktionen gesammelt, deren Aktivität größer als 14 mU/ml war.

Tab. 6 Ergebnisse der Gelfiltration

Aufgetragene Aktivität Lauf	(mU)	Aktivität in Peak A (mU)	Ausbeute ^{+))} (%)
1	440	392	89
2	1200	1045	87
3	2140	1923	90

^{+))} Mittelwert aller 3 Läufe: 88,7%

Da die Proteinkonzentration in Peak A erwartungsgemäß niedrig lag, wurde sie mit der empfindlicheren Methode von Lowry (35) bestimmt. Als Bezugsprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet.

Der gesammelte Peak A enthielt 0,25 mg Protein/ml. Bei einer durchschnittlichen Aktivität von 7,2 mU/ml errechnet sich eine spezifische Aktivität von 288 mU/mg; die Gelfiltration erbrachte also bei einer Ausbeute von 89% eine Anreicherung der Enzymaktivität um den Faktor 1,44. 25 µg von Fraktion A setzten im Bioassay 1,63 µg Kinin frei.

Abtrennung und Identifizierung eines Kallikrein-Inhibitors

In Peak B (gesammelt wurden nur die Gläser mit der höchsten 280 nm Absorption) wurde ein Kallikrein-Inhibitor gefunden. Sein Molekulargewicht liegt unter 10 000. 23 µg Protein B hemmen im Bioassay am Rattenuterus das Standard-Rattenharn Kallikrein (11 µg Kininfreisetzung) um 62%. Die Proteinkonzentration nach Lowry betrug im gesammelten Peak B 0,23 mg/ml.

Die Abtrennung des Inhibitors ist mitverantwortlich für die hohe Anreicherung des Kallikreins während der Gelchromatographie mit Sephadex G-100.

3.224 Gelfiltration an Sephadex G-150

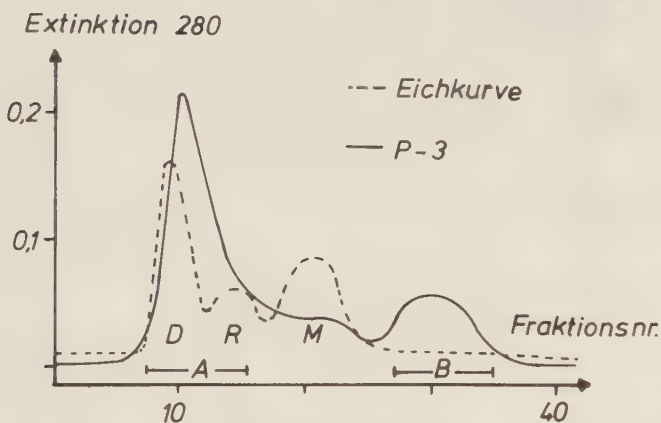
Vor allem im Hinblick auf eine präzise Molekulargewichtsbestimmung und um eine eventuelle Heterogenität in Peak A zu erkennen, wurde versucht, die Gelfiltrationsergebnisse noch zu verbessern. Es wurde ein Gel mit größeren Poren (Sephadex G-150) verwendet. Sein Anwendungsbereich liegt bei Molekulargewichten zwischen 5 000 und 400 000. Die erhoffte bessere Spreizung, vor allem des 50 000 - 100 000 Molekulargewichtsbereichs wurde erreicht. Peak A zeigte aber einen starken Nachlauf ("tailing") und ließ sich daher nicht gut abgrenzen. Möglicherweise war die Höhe der Gelsäule, die hier 55 cm betrug, zu gering.

Die Maße der Säule betrugen 1,5 x 70 cm, die Elutionsgeschwindigkeit 10 ml/Std. Das Ergebnis der Trennung zeigt Abb. 5.

Abb. 5 Gelfiltration von P (Präzipitat der Ammoniumsulfat-fällung) an Sephadex G-150

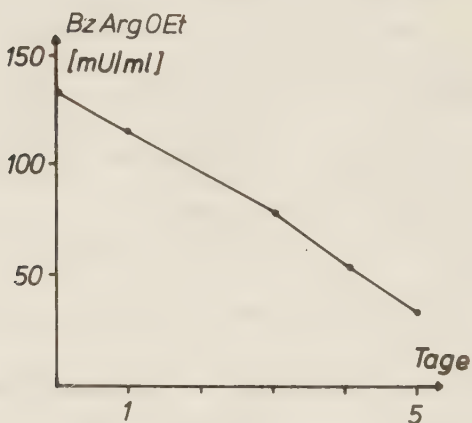
A = Peak A; B = Peak B; D = Dextranblau;

R = Rinderalbumin; M = Myoglobin



Die BAEE-Aktivität deckte sich wieder gut mit dem Absorptions-peak A, die Ausbeute lag im Mittel bei 86%. Das hieraus gesammelte Enzym erwies sich als sehr instabil. Eventuell waren hier Proteasen aktiviert oder nicht abgetrennt worden. Binnen sieben Tagen ging die Aktivität bei 4°C vollständig verloren (Abb. 6). Auch durch Tieffrieren und Lagern bei -20°C konnte die Stabilität nicht wesentlich erhöht werden.

Abb. 6 Labilität des Kallikreins in Fraktion A bei 4°C
in Tris/HCl-Puffer, pH 7,6



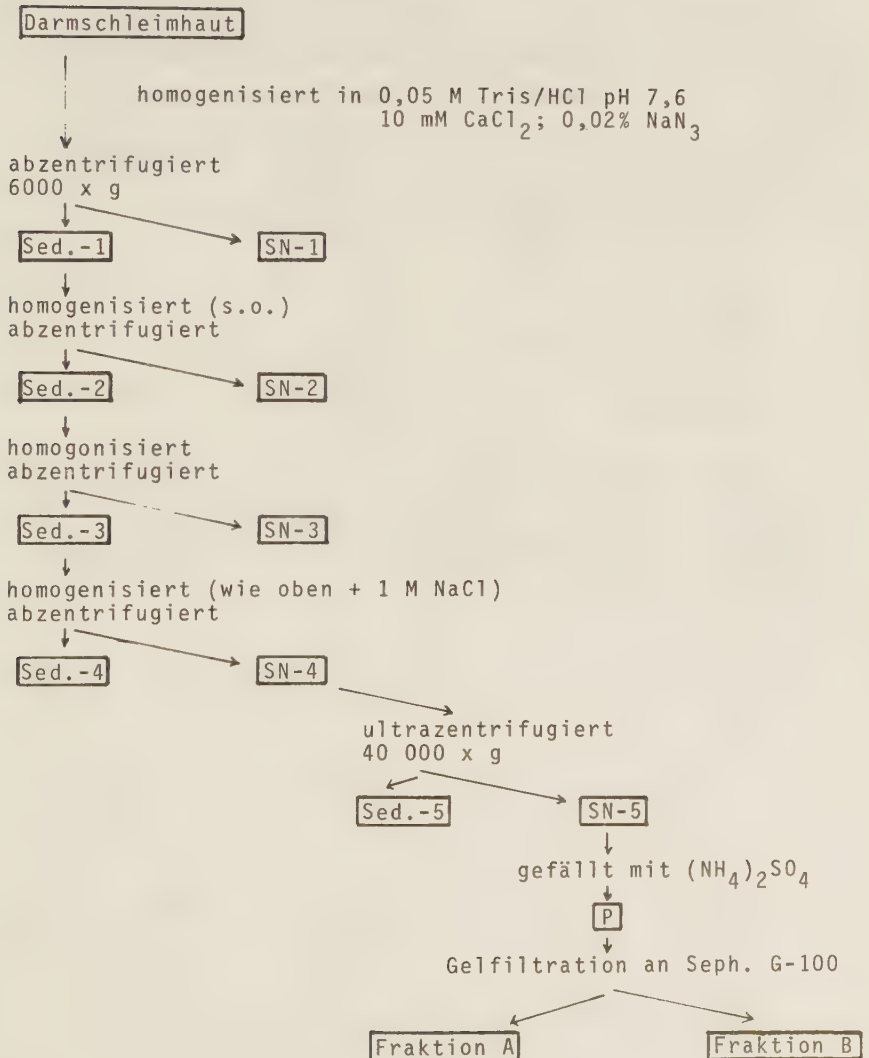
Günstigere Verhältnisse erbrachte die Anwendung von
Sephadex G-200 (s. Kap. 3.32).

3.23 Zusammenfassung der Isolierung

Tab. 7 Ergebnisse der Isolierung

Lösung bzw. Lösung von	Esterase- aktivität (mU/mg)	Ausbeute (%)	Protein- konzentration (mg/ml)	Reinigungs- faktor
SN-4	12,6	100	10,5	1
SN-5	181,8	97	0,7	14,4
Präzipitat (P)	200,0	40	3,9	15,9
Fraktion A (aus Sephadex G-100)	288	35	0,25	22,9

Schema der Isolierung



3.3 Untersuchungen am isolierten Enzym

3.31 Bestimmung des Molekulargewichtes

Bei der Gelfiltration mit Sephadex ist die Durchlaufgeschwindigkeit einer Probe von ihrem Molekulargewicht abhängig. Durch den Vergleich der Durchlaufgeschwindigkeit bekannter Moleküle mit der der zu untersuchenden Substanz ist eine Bestimmung des Molekulargewichtes möglich (34). Als Vergleichssubstanzen wurden verwendet:

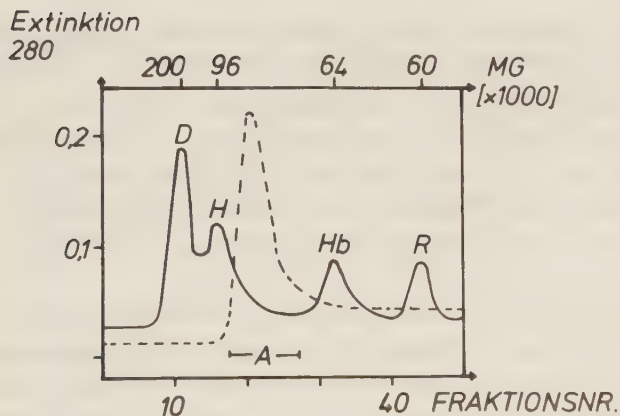
	MG
Albumin (Rind)	60 000
Hämoglobin (Rind)	64 000
Hexokinase	96 000
Dextran blau	2 000 000

Die Untersuchungen wurden mit Sephadex G-200 durchgeführt, da dieses im MG-Bereich um 100 000 gute Trennung bei noch akzeptabler Durchflußrate (5 ml/h) bietet. Die Säulengröße war wiederum 1,5 x 70 cm. Die Ergebnisse zeigt Abb. 7.

Abb. 7 Bestimmung des Molekulargewichtes von Fraktion A mittels Gelfiltration an Sephadex G-200

A = Peak A; D = Dextranblau; H = Hexokinase;

Hb = Hämoglobin; R = Rinderalbumin



Das Molekulargewicht des Enzyms liegt bei 70 000.

3.32 Die Aktivierung von Präkallikrein

3.321 Methodik

Einige Kallikreine liegen, ähnlich wie die Faktoren des Gerinnungssystems, als inaktive Vorstufen vor. Auch für den Darm ist das Vorkommen eines solchen Präkallikreins beschrieben worden (10, 29). Als Aktivierungsmechanismus der Präkallikreine wird angenommen, daß, wie bei anderen Enzymvorstufen, ein Peptid abgespalten werden muß, um das Enzym in seine aktive Form zu bringen. Die genaue Reaktion ist noch nicht bekannt. Die Aktivierung ist möglich durch Proteasen wie Trypsin, Papain und Plasmin (1, 2), die diese Spaltung bewirken. Zum anderen ist, wie beim Hage-

man-Faktor, auch eine Aktivierung allein durch Kontakt mit benetzbaren, negativ geladenen Oberflächen und durch Milieuveränderung beschrieben. Die Aktivierung des Präkallikreins kann z.B. erfolgen durch Kontakt mit Glas, Kaolin u.ä., durch Behandlung mit Aceton, Casein und durch Ansäuern (1, 2).

Auch am vorliegenden Kallikrein wurde versucht, die Ausbeute an wirksamem Enzym durch Aktivierung zu steigern. Ein Versuch der Aktivierung durch pH-Erniedrigung schlug fehl: Eine Probe wurde mit 2 N HCl auf pH 2 angesäuert und nach 30 min mit 2 N NaOH neutralisiert. Die Aktivität ging dabei vollständig verloren. Möglicherweise führte das sehr saure Milieu zu einer irreversiblen Schädigung des Kallikreins.

Die Aktivierung mit einem wasserunlöslichen Trypsin-Harz-Komplex in Anlehnung an Erdös et al. (10) zeigte besseren Erfolg: Zu 5 ml einer enzymhaltigen Lösung (45 mU/ml) wurden 10 mg Trypsin vom Schwein (ca. 20 U/mg), polymer gebunden an CM-Cellulose (Fa. Merck), zugesetzt und die Suspension 30 min bei 20°C geschüttelt. Der unlösliche Harz-Komplex wurde dann abzentrifugiert; es verblieb keinerlei lösliches Trypsin im Oberstand (Trypsin-Test s. Kap. 3.33).

Bei unveränderter Proteinkonzentration erhöhte sich die BzArgOEt-spaltende Aktivität von 45 mU/ml auf 62 mU/ml, d.h. um knapp 40%. Der Mittelwert aus 3 unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen lag bei 36% Aktivitätszunahme.

3.322 Ergebnisse der Aktivierung

Proben von SN-5, P und Fraktion A wurden Trypsinharz aktiviert wie in Kap. 3.321 beschrieben. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Tab. 8 Aktivierung von Präkallikrein

Lösung ^{+) von}	Ausgangsaktivität (mU)	Nach Trypsin-Harz- Aktivierung (mU)	Aktivitätszunahme (%)
SN-5	710	1040	46
P	2000	2760	38
A	2720	3780	39

^{+) Herstellung der Lösungen: s. Kap. 3.23}

Eine 100 μ l Probe von P (390 μ g) setzte im Bioassay aus 3 mg Kininogen 0,4 μ g Kinin frei, wogegen 390 μ g Trypsin-aktiviertes Enzym P 2,4 μ g Kinin bildete. Während also durch Aktivierung mit Trypsin-Harz die Esteraseaktivität um nur 40% anstieg, versechsfachte sich die biologische Aktivität. Eine derartig schlechte Übereinstimmung von Esterolyse und Kininfreisetzung beim Darmkallikrein wurde bereits früher beschrieben (10, 67, 68). Dieses Phänomen tritt bei allen Kallikreinisolierungen bzw. Aktivierungen in unterschiedlicher Ausprägung auf. Es wurde deshalb auch versucht, die Korrelation zwischen BzArgOEt-spaltender Aktivität und Kininfreisetzung als Charakteristikum für einzelne Enzymgruppen zu verwenden (67). Die unterschiedliche Aktivitätssteigerung ist offensichtlich darauf zurückzuführen, daß ein Teil der esterolytischen Aktivität nicht dem Kallikrein zuzuordnen ist (10).

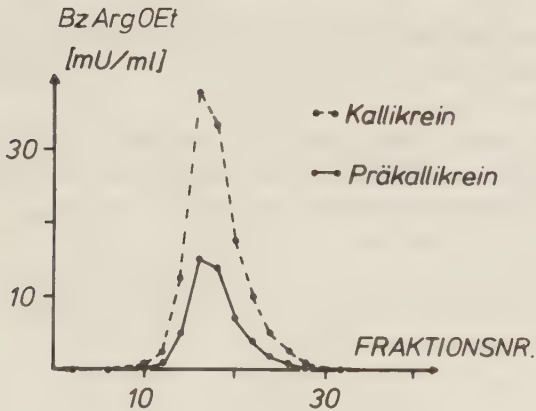
Bei der Trypsin-Aktivierung werden vielleicht auch solche Proteasen zerstört, die zwar BzArgOEt aber kein HMW-Kininogen spalten (68).

3.323 Einfluß der Aktivierung auf das Molekulargewicht

Über die Änderung des Molekulargewichts von Präkallikrein durch Aktivierung ist wenig bekannt (1, 11). Sie muß abhängig sein von der Größe des bei der Aktivierung abgespaltenen Teilstückes.

Eine Untersuchung hierzu wurde mit Hilfe der Gelfiltration durchgeführt. Wie in Kap. 3.223 beschrieben, wurde eine Probe von P (s. Kap. 3.221) an Sephadex G-100 fraktioniert. In jeder Fraktion wurde die enzymatische Aktivität und damit die Kallikreinmenge bestimmt (Abb. 8, unterbrochene Linie). Nun wurde jede Fraktion separat mit je 2 mg Trypsin-Harz aktiviert. Die dadurch gegenüber dem vorherigen Wert erreichte Aktivitätssteigerung entspricht der Menge des vorhandenen Präkallikreins (Abb. 8, durchgezogene Linie). Hätte das Präkallikrein ein wesentlich höheres Molekulargewicht als das Kallikrein, so wäre es bei der Gelfiltration früher eluiert worden, sein Aktivitätsgipfel müßte links von dem des Kallikreins liegen. Da das nicht der Fall ist, ergibt sich: Die Verteilung des Präkallikreins im Eluat unterscheidet sich nicht signifikant von der des aktiven Kallikreins. Eine wesentliche Änderung des Molekulargewichts durch Aktivierung ist also nicht anzunehmen.

Abb. 8 Molekulargewichtsrelation von Kallikrein und Präkallikrein



3.33 Untersuchungen zur Spezifität des Enzyms

Um Aufschluß über die Reinheit des gewonnenen Enzyms zu erhalten, mußte eine Vermischung mit anderen BzArgOEt-spaltenden Enzymen ausgeschlossen werden. Im Kolon ist dabei an eingeschwemmte Dünndarm-Enzyme zu denken, hier vor allem Trypsin, Enteropeptidase und Chymotrypsin.

Trypsin entsteht im Darm aus dem Produkt der Pankreaszellen Trypsinogen. Neben seiner proteolytischen Verdauungsfunktion bewirkt es auch eine spezifische Spaltung von Benzoyl-DL-arginin-p-nitranilid (BzArgNHp). Diese Reaktion kann photometrisch verfolgt werden (5):

Testansatz:

- 1,8 ml Puffer (0,2 M Triäthanolamin/HCl-Puffer pH 7,8)
- 1 ml Substratlösung (1 mg BzArgNHNP/ml aqua dest.)
- 0,2 ml Trypsinlösung (ca. 10 mU)

Die Extinktionszunahme bei der Reaktion wird über 5 min bei 405 nm gemessen; eine Extinktionsänderung von 0,332/min entspricht dabei 1 mU Trypsin.

Das vorliegende Enzym zeigte eine sehr geringe tryptische Aktivität (0,6 mU/mg). Diese ist evtl. darauf zurückzuführen, daß auch Kallikrein langsam BzArgNHNP spaltet.

Enteropeptidase ist das Enzym, das in vivo Trypsinogen zu Trypsin aktiviert. Es wird von Zellen der Dünndarmschleimhaut abgegeben. Sein Nachweis erfolgt anhand der natürlichen Funktion: Es wurden 100 µg Trypsinogen vom Rind (3,4 U/mg; Fa. Merk) mit 25 µg Fraktion A für 30 min bei 25°C inkubiert. Das durch Enteropeptidase gebildete Trypsin wurde wie beschrieben bestimmt. Durch das untersuchte Enzym (Fraktion A) konnte eine Trypsinfreisetzung nicht festgestellt werden.

Chymotrypsin ist wie Trypsin eine Endopeptidase, deren Bildungsort im Pankreas liegt. Zur Aktivitätsbestimmung eignet sich das synthetische Substrat N-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (Suphepa). Die Spaltung kann durch Photometrie verfolgt werden (37).

Testansatz:

- 1,8 ml Puffer (0,2 M Triäthanolamin/HCl-Puffer pH 7,8)
- 1 ml Substratlösung (2,5 mg Suphepa/ml aqua dest.)
- 0,2 ml Chymotrypsinlösung

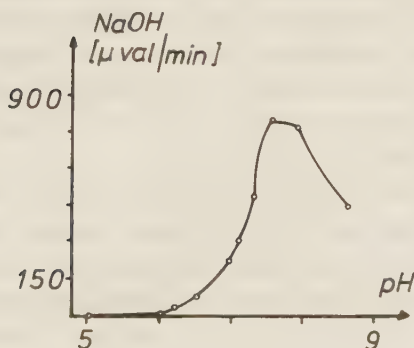
Der Reaktionsverlauf wird über 15 min bei 405 nm aufgezeichnet. Am untersuchten Enzym ließ sich keine Suphepa-spaltende Aktivität nachweisen.

Das isolierte Enzym enthält also weder Trypsin noch Enteropeptidase oder Chymotrypsin.

3.34 Untersuchung des pH-Optimums

Die BzArgOEt-Spaltung durch Kallikrein wurde mit dem Autotitrator verfolgt (s. Kap. 3.123). Der pH-Wert des Testansatzes, der durch die selbständige Zugabe von Natronlauge während der einzelnen Titrationen konstant gehalten wurde, wurde von Versuch zu Versuch schrittweise von pH 5,0 bis 8,7 gesteigert. Die Reaktionsgeschwindigkeit entspricht dem NaOH-Verbrauch pro Zeiteinheit. Ihre Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-Konzentration gibt Abb. 9 wieder.

Abb. 9 Reaktionsgeschwindigkeit der BzArgOEt-Spaltung in Abhängigkeit vom pH



Das pH-Optimum liegt demnach zwischen pH 7,5 und 8, d.h., es ist den Verhältnissen in vivo (7) angepaßt. Es handelt sich also um eine neutrale Protease.

3.35 Immunologische Untersuchungen

Auf Grund früherer Untersuchungen (10) war der Eindruck entstanden, im Darm könnte der Bildungsort des Plasmakallikreins liegen, das Darmkallikrein sei somit mit dem Plasmakallikrein identisch. Diese Frage wurde durch Vergleich der immunologischen Eigenschaften dieser beiden Enzyme untersucht.

Die von keinem anderen Verfahren überbotene Spezifität der natürlichen Antigen-Antikörper-Immunreaktion wird allgemein in der Proteinforschung genutzt. Injiziert man einem Versuchstier mehrmals ein bestimmtes Enzymprotein, so reagiert es mit der Bildung von Antikörpern, die wie ein Negativ ausschließlich zu diesem Protein passen. Auf diese Weise lassen sich spezifische Antikörper züchten und isolieren. Läßt man in einem Gel die erhaltenen Antikörper (Ak) gegen ihr zugehöriges Protein (Antigen = Ag) diffundieren, so fällt beim Zusammentreffen beider ein unlöslicher Antigen-Antikörper-Komplex aus. Dieser kann durch Färbung sichtbar gemacht werden. Mit dieser Methode ist also eine sehr subtile Identifikation von Proteinen möglich.

Die Kallikreine zeigen ein speziesspezifisches und zum Teil organspezifisches immunologisches Verhalten (1, 28). Mit geeigneten Kallikrein-Antikörpern (gerichtet gegen ein spezielles Kallikrein einer Spezies) läßt sich daher die Zugehörigkeit eines Kallikreins zu einer Spezies bzw. einem Organ beweisen oder ausschließen.

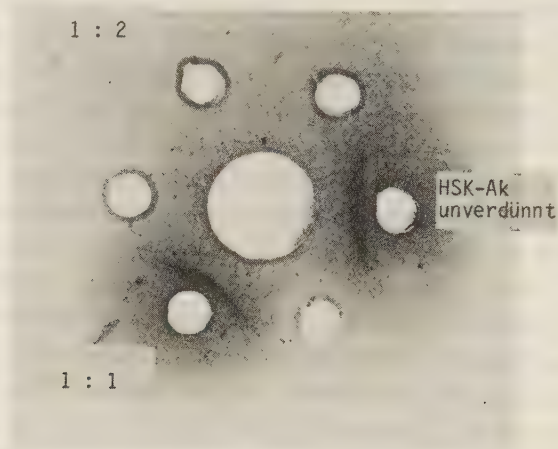
Als Verfahren wurde die Immundiffusion in Agar nach Ouchterlony gewählt (38). Auf eine Platte mit 2% Agarose-Gel wurde in eine zentrale Ausstanzung das jeweilige Antigen aufgetragen. Peripher hierzu wurde in radial angeordnete präformierte Stanzlöcher die Antikörper-Lösung in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Zur Anwendung kamen IgG Antikörper vom Kaninchen, die spezifisch gegen Humanserum-Kallikrein (HSK) gerichtet sind. Diese waren frei von Kallikrein-Inhibitoren.

Zur Kontrolle wurde HSK verwendet mit einer Aktivität von 1100 mU/ml und einem Proteingehalt von 0,58 mg/ml, d.h. einer spezifischen Aktivität von 1897 mU/mg. Wichtig ist nun bei der Immundiffusion, daß Antigen und Antikörper in einem ausgewogenen Mengenverhältnis zueinander stehen. Ist die Konzentration einer Komponente zu groß, so löst sich der präzipitierte Immunkomplex auf und ist somit nicht sichtbar. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß eine optimale Präzipitationslinie entstand, wenn die HSK- und Ak-Lösungen im Volumenverhältnis 1:1 gegeneinander diffundierten, d.h. wenn z.B. 5,5 mU HSK mit 5 μ l unverdünnter Ak-Lösung reagierten. Die Präzipitation war in diesem Fall bei einer Ak-Verdünnung von 1:1 eben noch sichtbar. Um die Identität von Serumkallikrein und Darmkallikrein zu überprüfen, wurden auf jeder Platte je 5 μ l folgender Ak-Verdünnungen eingesetzt: unverdünnt, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Gegen diese Ak-Verdünnungsreihe ließen wir Ag-Proben aus Fraktion A diffundieren: 0,45, 0,9, 3,6 und 9,3 mU (BzArgOEt-Spaltung), außerdem mit Trypsin-Harz aktivierte Fraktion A: 0,72, 1,44 und 9,9 mU.

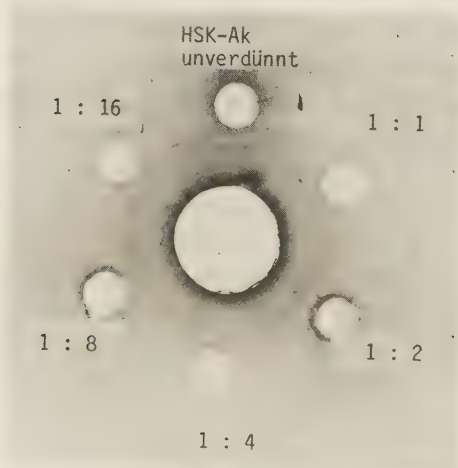
Ergebnis: Sämtliche Präzipitationsversuche mit Darmkallikrein blieben ohne Erfolg, während gleiche oder geringere Mengen HSK ein deutliches Immunpräzipitat bildeten. Als Maß für die eingesetzten Enzymmengen diente dabei die enzym. Aktivität (mU), s. Abb. 10.

Abb. 10 Immundiffusionstest nach Ouchterlony

a) Diffusion von 5,5 mU HSK (zentral) gegen
HSK-Ak



b) Diffusion von 0,45-9,3 mU Darmkallikrein
(zentral) gegen HSK-Ak



Obwohl, um Verunreinigungen Rechnung zu tragen, die eingesetzte Menge Darmkallikrein bis zum zweifachen der benötigten mU an HSK gesteigert wurde, bildete sich kein Immunpräzipitat.

Das mit seinem Antikörper präzipitierte Serumkallikrein zeigt keine biologische Aktivität mehr. Es wurden daher zur Kontrolle Darmkallikrein und HSK-Ak im als günstig ermittelten Verhältnis (9 mU Ag mit 5 μ l Ak-Lösung) inkubiert und das Verhalten der Enzymaktivität getestet. Die durch 25 μ g Enzym bewirkte Kininfreisetzung wurde durch diese Vorbehandlung nicht vermindert, auch die esterolytische Aktivität änderte sich nicht. Eine Reaktion des Antikörpers mit dem Enzym war also nicht erfolgt.

Eine Identität des isolierten Darmkallikreins mit HSK ist damit ausgeschlossen.

Versuche von R. Geiger, das isolierte Darmkallikrein in ähnlicher Weise mit Antikörpern gegen menschliches Harnkallikrein zu präzipitieren, verliefen ebenfalls negativ. Das Darmkallikrein unterscheidet sich demnach auch vom Harnkallikrein.

3.36 Bestimmung des Hemmspektrums

Enzyme können in ihrer Wirksamkeit auf verschiedene Weise beeinflußt werden, ein Umstand, der einerseits von der lebenden Zelle zur Regulation von Enzymaktivitäten ausgenutzt wird, andererseits aber in der Praxis benutzt werden kann, um ein Enzym durch seine Reaktionsweise mit spezifischen Hemmstoffen zu charakterisieren. Enzymaktivitäten können reversibel (z.B. durch Substrat-ähnliche Stoffe) oder irreversibel gehemmt werden.

Man unterscheidet verschiedene Typen der Hemmung:

Kompetitive Hemmung liegt dann vor, wenn ein Molekül mit dem Substrat um die Bindung am aktiven Zentrum konkurriert.

Nichtkompetitive Hemmung tritt dann ein, wenn ein Hemmstoff das aktive Zentrum so beeinflußt, daß das Substrat noch gebunden wird, der Reaktionsverlauf aber verzögert ist.

Substrat oder Produkthemmung. Bei hoher Substratkonzentration können sich mehrere Substratmoleküle an das Enzym anlagern und dadurch die Reaktion behindern. In ähnlicher Weise können Endprodukte der Reaktion in höherer Konzentration hemmen. Kinetisch entspricht die Produkthemmung einer kompetitiven Hemmung.

Allosterische Hemmung. Der Inhibitor wird an einem anderen Ort des Enzyms gebunden als das Substrat. Als Ursache der Hemmung nimmt man an, daß die Bindung des Hemmstoffs zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt.

Die Bestimmung des jeweiligen Hemmtyps erfolgt zumeist durch graphische Auswertung der Kurven, die durch Messung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit und ohne Hemmstoffzusatz erhalten werden.

Die Bestimmung des Hemmspektrums des isolierten Enzyms ist deshalb bedeutungsvoll, da es damit klassifiziert (Organ- oder Serumkallikrein) werden kann. Die Unterscheidung zwischen Organ- und Plasmakallikrein basiert nicht zuletzt auf der unterschiedlichen Hemmbarkeit der beiden Enzymtypen. Außerdem lassen sich durch Hemmtests Verunreinigungen mit anderen Enzymen nachweisen: Wird die Aktivität durch einen nicht gegen Kallikrein wirksamen Trypsin- bzw. Chymotrypsin Inhibitor gemindert, so muß eine zusätzliche trypsin- oder chymotrypsinähnliche Protease vorliegen.

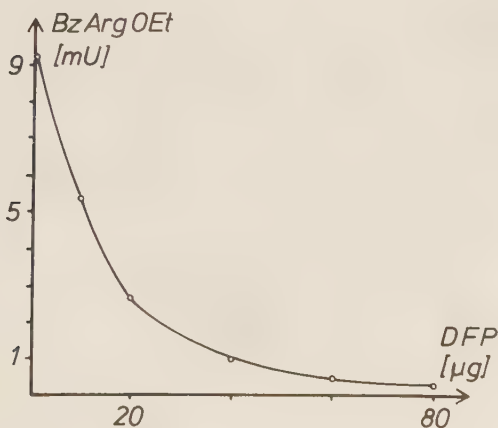
Die Hemmtests wurden durchgeführt mit dem modifizierten BzArgOEt/ADH-Test. Die Inhibitoren wurden 10 min bei 25°C mit dem Enzym in Tris/HCl pH 7,8 vorinkubiert (9, s. Kap. 3.123). Bei den wichtigsten Hemmstoffen wurden vergleichende Untersuchungen mit Humanserum-Kallikrein durchgeführt.

3.361 DFP-Wirkung

Die Proteasen werden in verschiedene Gruppen unterteilt. Eine davon, der neben Trypsin, Chymotrypsin und Thrombin

auch das Kallikrein angehört, ist durch einen Serinrest im aktiven Zentrum gekennzeichnet. Dieser kann spezifisch durch den Phosphorsäureester Diisopropylfluorophosphat (DFP) blockiert und damit die Zugehörigkeit zu den Serinproteasen nachgewiesen werden. 10 mU des Darmkallikreins wurden durch 100 µg DFP zu 96% gehemmt (Abb. 11). Es wurde ein DFP-Präparat der Fa. Sigma verwendet (MG 184,15; Dichte 1,063). Das gefundene Enzym ist also auch eine Serinprotease.

Abb. 11 Inaktivierung des Darmkallikreins durch DFP



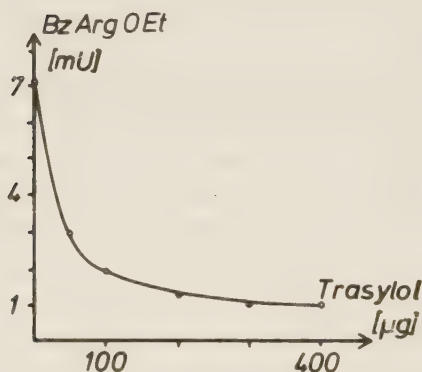
3.362 Trasylol-Wirkung

Der von E. Werle entdeckte "polyvalente Rinder-Inhibitor" ist ein Proteasen-Inhibitor mit sehr breitem Wirkungsspektrum. Er wurde schon frühzeitig bei der Therapie der Pankreatitis eingesetzt. Sein Handelsname ist Trasylol®.

Dieser Inhibitor ist der einzig bekannte, der alle menschlichen Kininogenasen hemmt und von nahezu keinem Enzym zerstört wird. Trasylol, das ein relativ geringes Molekulargewicht (6513) hat, geht im Komplex mit dem Kallikrein eine reversible Bindung ein und blockiert dabei alle Enzymfunktionen.

Hier wurde Trasylol der Fa. Bayer verwendet (5700 KIE/mg) 100 μ g Trasylol hemmten 10 mU Darmenzym zu 92%.

Abb. 12 Trasylol-Wirkung auf die Aktivität des Darmkallikreins



3.363 Wirkung von Inhibitoren aus Humansperma

Zur Anwendung kamen HUSI I und II. Beides sind Inhibitoren aus menschlichem Seminalplasma. Sie stellen dort den natürlichen Schutz gegen den hydrolytischen Angriff von Proteasen dar (46). Hier wurden sie eingesetzt, um eventuelle Verunreinigungen des gefundenen Darmkallikreins mit anderen Proteasen zu erkennen.

Die Hemmaktivität von HUSI II ist streng auf Trypsin und Akrosin limitiert (44). Durch HUSI II erfolgte keine meßbare Aktivitätsminderung des Enzyms.

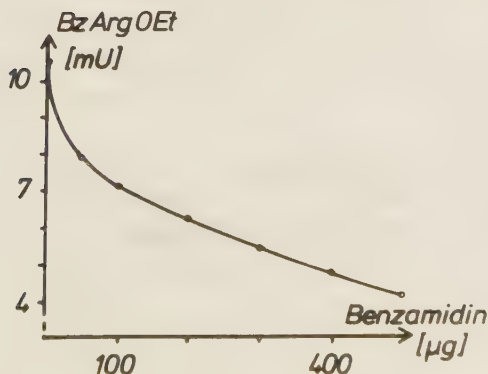
HUSI I, der immunologisch mit einem Inhibitor aus Bronchialsekret identisch ist (45), besitzt ein breites Hemmspektrum: Neben den pankreatischen Enzymen Trypsin und α -Chymotrypsin hemmt HUSI I Proteasen aus lysosomalen Granula, u.a. Elastase und Cathepsin G. Kallikreine werden durch HUSI I wie auch von HUSI II nicht inaktiviert. Der Humansperma-Inhibitor I zeigte am untersuchten Enzym keine Wirkung.

3.364 Benzamidin-Wirkung

Benzamidin ist ein effektiver kompetitiver Trypsin-Inhibitor. Auch am Kallikrein wirkt Benzamidin durch kompetitive Verdrängung des synthetischen Substrates (BzArgOEt).

100 μg Benzamidiniumchlorid (Fa. Merk) hemmten 10 mU Enzym zu 30%. Die Inhibitorkonzentration betrug 0,2 m Mol/l

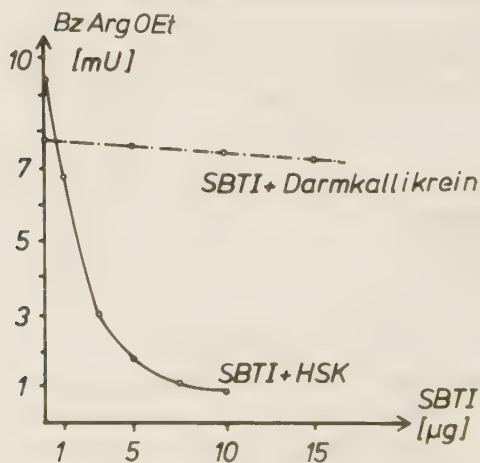
Abb. 13 Benzamidinwirkung auf Darmkallikrein



3.365 Pflanzliche Inhibitoren

Aus Lima- und Sojabohnen sind Trypsin-Inhibitoren isoliert worden (LBTI, SBTI). Sie wirken auf Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin (SBTI und LBTI) und Plasmakallikrein (SBTI), nicht jedoch auf Organkallikreine und Thrombin. Es ist jedoch eine geringe Hemmwirkung von SBTI auf Darmkallikrein beschrieben worden (2). Auch das vorliegende Enzym wurde durch SBTI (Präparat der Fa. Merk) schwach gehemmt: 100 μg hemmten 10 mU Kallikrein A um 37%. Abb. 14 zeigt zugleich die wesentlich stärkere Hemmung eines Serumkallikreins zum Vergleich. Der Trypsin-Inhibitor aus Limabohnen (von P-L Biochemicals, Milwaukee) zeigte, wie bei allen anderen Organkallikreinen, keine meßbare Hemmwirkung.

Abb. 14 SBTI-Wirkung auf Darm- und Serumkallikrein



3.366 Proteasen-Inhibitoren des Blutplasmas

Gerade in den letzten Jahren ist die Erforschung der körpereigenen Protease-Inhibitoren stark vorangetrieben worden. In Plasma zeigen u.a. verschiedene Fraktionen der α -Globuline starke Hemmwirkung:

Menschliches α_1 -Antitrypsin hemmt neben Trypsin auch Chymotrypsin, Elastase, Plasmin und Serunkallikrein. Es ist für ca. 90% der gesamten Trypsin-Inhibitor-Aktivität des Plasmas verantwortlich (69). Ein Präparat der Behring-Werke zeigte am untersuchten Enzym keine Wirkung.

α_2 -Makroglobulin blockiert die aktive Form der meisten Endopeptidasen irreversibel. Es wird dabei die Wirkung der Enzyme auf hochmolekulare Substrate gehemmt (70). Ein Präparat der Behring-Werke (100 μ g) hemmte 10 mU Darmkallikrein A um 38%.

3.367 Weitere Inhibitoren

TLCK (N-Tosyl-L-lysyl-chlormethanhydrochlorid) hemmt das Plasmakallikrein irreversibel. Die Darmkallikrein-Aktivität wurde durch ein TLCK-Präparat der Fa. Merck nicht verändert.

NPGB (Para-nitrophenyl-para-guanidinobenzoat) ist ein Trypsin-Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum. Ein Präparat der Fa. Merck (100 μ g) hemmte 10 mU Enzym A zu 84%.

EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) bildet mit einigen Metallen Chelate. Dadurch verlieren diese ihre Kationeneigenschaften. Metallhaltige Enzyme können so in ihrer Struktur geändert und dadurch gehemmt werden. Das untersuchte Enzym wurde durch EDTA nicht gehemmt.

3.368 Ergebnisse

Tab. 9 Hemmspektrum des Darmkallikreins und von Human-serumkallikrein (HSK)

Hemmstoff (eingesetzte Menge: 100 µg)	Hemmung von 10 mU des Enzyms in %	Hemmung von HSK in %
DFP	96	97
TLCK	0	+
NPGb	84	
EDTA	0	
Benzamidin	30	90
Trasylo1	92	95
HUSI I und II	0	0
SBTI	37	92
LBTI	0	0
α_1 -Antitrypsin	0	+
α_2 -Makroglobulin	38	+

4. Diskussion

4.1 Isolierung des Enzyms

Mit der erarbeiteten Isolierungsmethode steht ein Verfahren zur Verfügung, um Darmkallikrein mit relativ wenig Aufwand und ausreichender Ausbeute stark anzureichern. Das mehrmalige Homogenisieren des Gewebes in Salzlösungen mit relativ geringer Ionenstärke hat den Vorteil, daß vor allem andere Proteine abgetrennt werden. Die beim zweiten Homogenisieren gegenüber dem ersten Extrakt erhöhte Ausbeute und spezifische Aktivität des Kallikreins ist evtl. mit einer Ausschwemmung von Inhibitoren beim erstmaligen Homogenisieren zu erklären. Die Tatsache, daß die maximale Menge an Kallikrein jedoch beim Homogenisieren des Gewebes in 1M NaCl-Lösung extrahiert wurde, erhärtet den bereits früher geäußerten Verdacht, daß zumindest ein Teil des Kallikreins in gebundener Form im Gewebe vorliegt (3). Derartig stark polare Lösungen sind in der Lage, auch schwer lösliche, z.B. membran-gebundene Proteine zu extrahieren. Das anschließende Verfahren der Ammoniumsulfatfällung brachte eine gute Reinigung, ist aber infolge der schlechten Trennbarkeit von Präzipitat und Überstand nicht voll befriedigend. Die anschließende Gelfiltration an Sephadex G-100 erwies sich als geeignet zur Abtrennung weiterer Begleitproteine.

Eine zusätzliche Reinigung durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von Trasylol-Harz (35, 42) schien nicht aussichtsreich, da die schlechte Löslichkeit des Präparates nach Lyophilisation eine genug hohe Konzentrierung der Aktivität nicht zuließ. Aus früheren Untersuchungen in unserem Labor ist bekannt, daß Enzyme bei zu geringer Konzentration nicht oder nicht ausreichend vom wasserunlöslichen Inhibitorharz gebunden werden. Eine weitere Reinigung wäre wahrscheinlich durch Chromatographie an DEAE-Sephadex zu erreichen; wir wissen jedoch aus frühe-

ren Erfahrungen, daß auch hier größere Probleme infolge der geringen Menge bzw. Konzentration des zur Verfügung stehenden Kallikreins auftreten können: das Enzym bleibt dabei oft an inerte, stark bindende Begleitsubstanzen assoziiert.

Für das im Rahmen dieser Arbeit gesteckte Ziel - die Herstellung von enzymatisch einheitlichem Kallikrein, war eine weitere Reinigung nicht mehr erforderlich, da störende Enzymbeimischungen nicht mehr vorlagen. Der erreichte Reinheitsgrad des Kallikreins erwies sich für die durchzuführenden Versuche als ausreichend (s.u.).

Die ausgearbeitete Methode bietet gegenüber früheren Verfahren wesentliche Vorteile: Das von Zeitlin beschriebene Verfahren (6), nämlich das der Autolyse überlassene, abzentrifugierte Homogenat lediglich mittels einer Gel-filtration aufzutrennen, bewirkt nur eine mäßige Reinigung und ist evtl. mit einem partiellen enzymatischen Abbau des Kallikreins (Autolyse) verbunden. Die von Erdös (10) angegebene Methode ähnelt der hier entwickelten, ist aber durch die zusätzliche Anwendung der DEAE-Cellulose-Chromatographie aufwendiger und erbringt nur eine geringere Anreicherung der esterolytischen Aktivität.

4.2 Einordnung des gefundenen Enzyms

Das Enzym zeigt esterolytische Aktivität an BzArgOEt. Es ist bekannt, daß BzArgOEt gespalten wird durch Trypsin, Enteropeptidase, Plasmin, Thrombin, Kallikrein und durch Argininesterasen aus Serum und Pankreas. Als Begleitenzyme kommen vor allem Trypsin, Enteropeptidase und bakterielle Proteasen des Darmtraktes in Frage.

Das Vorhandensein dieser bzw. solcher Enzyme wurde durch entsprechende spezifische Enzymtests ausgeschlossen (s. Kap. 3.33). Die weitere Charakterisierung des Enzyms erfolgte über das Hemmspektrum. Infolge Unwirksamkeit der entsprechenden Inhibitoren fällt die Möglichkeit einer Beimischung oder das Überwiegende Vorliegen folgender Enzyme weg:

1. Trypsin, da keine Hemmung durch HUSI I und II, α_1 -Antitrypsin und LBTI erfolgte;
2. Plasmin, da weder α_1 -Antitrypsin noch LBTI hemmten;
3. Thrombin, da keine Hemmung durch LBTI und Hirudin (Thrombin-spezifischer Inhibitor) nachzuweisen war;
4. Elastase, da keine Hemmung durch LBTI, α_1 -Antitrypsin und den Elastase-Inhibitor aus Blutegeln erfolgte;
5. Proteasen aus lysosomalen Granula, da keine Hemmung durch HUSI I erfolgte.

Die Hemmung mit den gegenüber Organkallikreinen wirksamen Hemmstoffen wie DFP, Trasylol, Benzamidin und NPGB war dagegen ausgeprägt.

Das Enzym folgt somit in seinem Verhalten gegenüber Inhibitoren dem für die Kallikreine bekannten Schema. Da die Substanz außerdem Kininogen zu Kinin spaltet, ist sie als Darmkallikrein einzuordnen.

Eine Klassifizierung als Organ- oder Plasmakallikrein gemäß dem in Kap. 2.12 gegebenen Schema gelang jedoch nicht. Das gefundene Molekulargewicht ähnelt mit 70 000 dem des Plasmakallikreins und stimmt mit den von Erdös (10) gemachten Angaben überein. Das Spektrum der wirksamen Hemmstoffe weicht von dem des Plasmakallikreins erheblich ab: Die Hemmstoffe,

die ausgeprägt auf das Plasmakallikrein, nicht jedoch auf die Organkallikreine wirken, blieben hier ohne bzw. nahezu ohne Effekt. Es handelt sich dabei vor allem um TLCK und SBTI. Insgesamt gleicht also das Hemmspektrum des Darmkallikreins weitgehend dem der Organkallikreine.

Eine eingehende Untersuchung des Hemmspektrums des Darmkallikreins ist bisher nicht beschrieben worden, es wurde nur die Wirkung weniger Inhibitoren untersucht. Die von Erdös (10) gefundene Hemmung mit LBTI konnte von uns nicht bestätigt werden. Die ebenfalls beschriebene schwache Hemmwirkung von SBTI auf Kolonkallikrein war auch am hier untersuchten Enzym nachweisbar. Diese Hemmung ist aber so viel geringer als die SBTI-Hemmung am Plasmakallikrein, daß sich daraus eine Identität von Kolon- und Plasmakallikrein nicht herleiten läßt.

Die sehr spezifische Methode der Ag-Ak-Agglutination ist eine weitere Möglichkeit, die unterschiedliche Identität von Darmkallikrein und HSK nachzuweisen. Die Theorie von Erdös (10), der Darm könnte ein Bildungsort der Plasmakallikreine sein, konnte nicht bestätigt werden: Darmkallikrein reagierte nicht mit HSK-Antikörpern. Außerdem hatte schon das von Erdös untersuchte Kolonkallikrein LMW-Kininen gespalten, das ja das bevorzugte Substrat der Organkallikreine ist.

Das Darmkallikrein dürfte somit als ein organgebundenes, lokal wirksames Kallikrein zu betrachten sein. Infolge seiner biochemischen Eigenschaften (u.a. MG) läßt es sich jedoch nicht in das bisherige einfache Zwei-Gruppen-Schema der Kallikreine (s. Tab. 1) einordnen.

4.3 Medizinische Bedeutung

Wesentlich ist am Darmkallikrein die lokale Wirkung: Die Beeinflussung der Absorption der verschiedensten Substanzen (23, 24, 25, 63) und die Erhöhung der DNS-Syntheserate

(21, 22) durch Kallikrein und die beschriebene Beeinflussung der Kolonmotilität durch Kinin (64, 65) können physiologische Regelfunktionen des Kallikrein-Kinin-Systems sein.

Die Beteiligung des Darmkallikreins an einigen gastrointestinalen Erkrankungen scheint gesichert, sei es nun in einem frühen oder späten Stadium der Pathogenese. Eventuell werden Motilitätsstörungen des Darmes wie bei colitis ulcerosa einmal mit Kallikrein-Inhibitoren zu behandeln sein (64). Auch der bisher nur zum Teil geklärte Mechanismus der Trasylol-Therapie beim Schock könnte seine biochemische Basis in der Hemmung von gastrointestinalem Kallikrein haben (32).

5. Literaturverzeichnis

- 1 E.K. Frey, Kraut, Werle, "Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren". Enke, Stuttgart (1968)
- 2 Hrsg. Erdös: Handbuch der exper. Pharmakologie XXV "Bradykinin, Kallidin and Kallikrein"
- 3 Webster; in: Handbook of exper. Pharmacology XXV S. 131, Springer (1970)
- 4 H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse" S. 1071 "Kallikrein", Verlag Chemie, Weinheim (1974)
- 5 Meth. d. enzym. Analyse: Fritz, Trautschold, Werle "Proteaseinhibitoren" S. 1105
- 6 Naunyn-Schmiedeberg's, Arch. Pharmacology 293 pp 159-161 (1976)
- 7 Siegenthaler "Klinische Pathophysiologie" Thieme (1976)
- 8 Werle, Vogel, Kaliampetsos; Karger, Basel; II S. 778
- 9 Wunderer, Kummer, Fritz; Hoppe-Seylers Z. Bd. 353, S. 1646-1650 (1972)
- 10 Seki, Nakajima, Erdös; "Colon Kallikrein" Biochemical Pharmac. Pergamon Press (1972)
- 11 Erdös; "Commentary the Kinins" Biochem. Pharmac. Pergamon Press (1976)
- 12 Werle, Vogel; Arch. int. pharmacodyn. 131, 257 (1961)
- 13 Haberland, Rohen; "Kininogenases", Schattauer (1973)

- 14 Ehret; Dissertation Fachber. Chemie u. Pharmazie
Mchn. (1976)
- 15 B. Dittmann; Dissertation, med. Fak. d. Univ. München
(1972)
- 16 Erdös, Yang; "Bradykinin, Kallidin und Kallikrein"
Handbook of exper. Pharmac., Springer (1970) S. 289
- 17 K.D. Wuepper; J. exp. Med. 138. 1345 (1973)
- 18 Hirsch, Nakajima, Oshima; J. surg. Res. 17. 147 (1974)
- 19 Nustad, Vaaje, Pierce; Br. J. Pharmac. 53. 229 (1975)
- 20 Marin-Grez, Carretero; in: Haberland, Rohen; Kinino-
genases, Schattauer-Verlag S. 113 (1973)
- 21 Rohen, Peterhoff; in: Haberland, Rohen; Kininogenases
Schattauer-Verlag S. 147 (1973)
- 22 Schütte, Eggert, Lindner; in: Haberland, Rohen;
Kininogenases 3, Schattauer-Verlag S. 147 (1975)
- 23 Meng, Haberland; in: Haberland, Rohen; Kininogenases,
Schattauer-Verlag S. 75 (1973)
- 24 Moriwaki, Fujimori; in: Haberland, Rohen; Kinino-
genases 3, Schattauer-Verlag S. 57 (1975)
- 25 Dennhardt, Haberich; in: Haberland, Rohen; Kininogenases
Schattauer-Verlag S. 81 (1973)
- 26 Mann, Geiger, Werle; "A Sensitive Kinin Liberating
Assay"; in: Kinins; Sicuteri (1976)
- 27 Geiger: pers. Mitteilung

- 28 Narendra, Vasudev, Randall; in: Biochem. Pharmac. Vol. 25, S. 1607 Pergamon Press (1976)
- 29 Werle; in: Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels; S. 199 Pergamon Press, Oxford (1960)
- 30 Fiedler, Hirschauer, Werle; Hoppe-Seylers Z. Bd. 356, S. 1879 (Dez. 1975)
- 31 Habermann, Klett; Biochem. Zeitschrift 346, S. 133 (1966)
- 32 Erdös; Advances of Pharmacol. 4:1 (1966)
- 33 Pierce, J.; Handbook of exper. Pharmacol. XXV, S. 21 Springer (1970)
- 34 Sephadex "Gel filtration in theory and practice" Pharmacia, Uppsala (1969)
- 35 Lowry, Rosebrough, Randall; J. biol. Chem. 193. 265 (1951)
- 36 Meth. d. enzym. Analyse von H.U. Bergmeyer, S. 184 Verlag Chemie (1974)
- 37 Nagel, Willig, Peschke; Hoppe-Seylers-Z. phys. Chem. 329, 278 (1962)
- 38 Ouchterlony; Acta path. microbiol. scand. 26. 507 (1949)
- 39 Brendel, Haberland; "Neue Aspekte der Trasylol Therapie 5" Schattauer-Verlag (1972)
- 40 Breddin, Eisenbach; "Neue Aspekte der Trasylol Therapie 7" Schattauer-Verlag (1975)

- 41 Nakajima, Seki, Erdös; in: Protides of the Biological Fluids, Vol. 20, S. 323, Pergamon Press (1973)
- 42 Fritz, Förg-Brey; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 901 (1972)
- 43 Sephadex Ionenaustauscher, Pharmacia, Uppsala (1969)
- 44 H. Schiessler, M. Arnhold, K. Ohlsson, H. Fritz (1976)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., Bd. 357, S. 1251-1260
- 45 K. Ohlsson, H. Tegner, H. Fritz, H. Schiessler (1976)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie, Bd. 357, S. 1241-1244
- 46 H. Schiessler, M. Arnhold, H. Fritz; in: Structure and Function of Human Proteinase Inhibitors S. 163-169 (1976)
- 47 E. Werle, F. Fiedler, H. Fritz; Proc. 5th Int. Congr. Pharmacol., San Francisco, Vol. 5, S. 284 (1972)
- 48 Haberland, Symposion: "Neue Aspekte der Hochdrucktherapie", Bonn, 9. Okt. 1976
- 49 Nature, Vol. 248, Nr. 5449 pp 597-598
- 50 K.D. Wuepper, Ch. Cochrane; Proc. soc. exp. Biol. and Med. 141, S. 271-276 (1972)
- 51 C. Burrowes, F. Habal, H. Movat; Thrombosis research Vol. 7 pp. 175-183 (1975)
- 52 S. Nagasawa, H. Takahashi; Biochem. Biophys. Res. Commun. 255, S. 1142 (1970)
- 53 S. Ruddy, I. Giggli, K.F. Austen; New Engl. J. Med. 287, S. 545 (1972)

- 54 E.G. Erdös; *Circulation Res.* 36, S. 247 (1975)
- 55 J.H. Mills, P.E. Ward; *J. Physiol.* 245, pp. 695-707 (1975)
- 56 W.B. Schill; *Der Hautarzt* 26, S. 541-542 (1975)
- 57 W.-B. Schill; *Dtsch. Med. Wochenschr.* Vol. 101 Nr. 48, S. 1773 (1976)
- 58 R.H. Rixon, J.F. Whitfield; in: *Haberland, Rohen; Kininogenases*, S. 131 (1973)
- 59 J.W. Rohen; in: *Haberland, Rohen; Kininogenases* S. 95 (1973)
- 60 E. Amundsen, K. Nustard; *J. Physiol. (Lond.)* 179 pp. 479-488 (1965)
- 61 A. Burger, F. Lembeck, J. Wagner; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 261, pp. 412-421 (1968)
- 62 I.J. Zeitlin; in: *N. Back, F. Sicuteri; Vasoactive Peptides*, pp. 289-296 (1972)
- 63 H. Rumpeltes, P. Koeppe, W. Pribilla; in: *Haberland, Rohen, Kininogenases* 3, S. 63 (1975)
- 64 I.J. Zeitlin, A.N. Smith; *J. of the Brit. Soc. of Gastroent.* Vol. 14 pp. 133-138 (1973)
- 65 Fishlock; *Nature (Lond.)* 212, pp. 1533-1535 (1966)
- 66 C.J.O.R. Morris, P. Morris; in: *Separating Methods in Biochem.* S. 974 (Pitman Publishing, 1972)
- 67 M. Lemon, B. Foerg-Brey, H. Fritz; in: *Kinins, Pharmacodyn. and Biol. Roles* (1976)

- 68 Th. Bettels; Dissertation, Institut f. Klin. Chem.
München (1976)
- 69 L.F. Kress, M. Lashowski, Sr.; in: Proteinase
Inhibitors von H. Fritz, S. 23 (Springer-Verlag 1974)
- 70 A.J. Barrett, P.M. Starkey; in: Proteinase Inhibitors
von H. Fritz, S. 72 (Springer 1974)
- 71 E. Buchborn, München; pers. Mitteilung

6. Lebenslauf

Am 19.9.1954 wurde ich als Sohn des Physikers Dr. Heinz Billing und seiner Ehefrau Anneliese Billing, geb. Oetker, geboren. 1958 kam ich nach München. Hier besuchte ich von 1960 bis 1964 die Volksschule und von 1964 bis 1973 das Max-Planck-Gymnasium. Im WS 1973 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität München und hatte im August 1975 die ärztliche Vorprüfung.

Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich herzlich für die
großzügige Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Kortmann für
zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen.

